

Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Tesi di laurea

Associazione fra γ -glutamil-transferasi e
rischio di diabete tipo 2

Relatore:

Dott. Roberto Miccoli

Candidata:

Isabella Crisci

Anno Accademico 2006-2007



Indice

	<i>pagina</i>
1. Classificazione e criteri diagnostici per diabete e pre-diabete	4
2. Epidemiologia del diabete mellito tipo 2 e del pre-diabete	7
1. Cambiamenti socio-ambientali e loro influenza sull'epidemia di diabete	10
3. Eziologia del diabete mellito tipo 2	12
1. Fattori genetici	12
2. Fattori ambientali	13
a. Obesità	
b. Attività fisica	
c. Dieta	
3. Interazione geni-ambiente	16
4. Patologie predisponenti	17
4. Patogenesi del diabete mellito tipo 2	20
1. Insulino-resistenza	20
2. Deficit di secrezione β -cellulare	22
5. Pre-diabete: IFG vs IGT	23
6. Identificazione dei soggetti a rischio	25
1. Screening del diabete	25
2. Soggetti a rischio	26
3. Test di screening	27
a. Glicemia a digiuno	
b. Curva da carico orale di glucosio	
c. Glicemia casuale	
d. Glicosuria	
e. Emoglobina glicata	
f. Questionari	
g. Algoritmi di rischio	
7. Fattori di rischio emergenti	31
1. Infiammazione	31
2. Enzimi epatici	35
8. Prevenzione del diabete tipo 2	38
1. Studi di intervento sullo stile di vita	39
a. Da Quing IGT and diabetes study	

b. Finish Diabetes Prevention Study	
c. Diabetes Prevention Program	
d. Studio Giapponese	
2. Studi di intervento farmacologico	43
a. Diabetes Prevention Program	
b. STOP-NIDDM	
c. Troglitazone in the Prevention of Diabetes Mellitus	
d. Xenical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects	
e. Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication (DREAM)	
f. Altri studi che hanno valutato la prevenzione del diabete.	

Bibliografia	50
--------------	----

Parte sperimentale

Il livello di gamma-glutamyl-transferasi contribuisce a identificare i soggetti ad alto rischio di diabete

Introduzione	66
Razionale e obiettivi dello studio	70
Pazienti e Metodi	71
1. Soggetti esaminati	
2. Parametri di laboratorio	
3. Analisi statistica	
Risultati	73
Discussione	78
Bibliografia	82

1. Classificazione e criteri diagnostici per diabete e pre-diabete

Il diabete mellito è una sindrome caratterizzata da alterazioni metaboliche, in particolare iperglicemia, dovuta ad un deficit assoluto o relativo di insulina, associato ad una sua ridotta efficacia biologica (insulino-resistenza). Gli effetti a lungo termine del diabete includono il progressivo sviluppo di specifiche complicanze che interessano sia i piccoli vasi (microangiopatia), come la retinopatia con potenziale cecità, la nefropatia che può portare a insufficienza renale, la neuropatia e le alterazioni osteo-articolari specifiche, sia i grandi vasi (macroangiopatia) con aumentato rischio di patologia cardiovascolare, cerebrovascolare e vasculopatia periferica. I soggetti con diabete hanno una mortalità del 38 – 40% più alta rispetto alla popolazione normale (1) ed una ridotta qualità di vita.

Recenti progressi nella comprensione dell'eziologia e della patogenesi del diabete hanno portato a una revisione della sua classificazione. In passato erano stati identificati due maggiori tipi di DM in base al criterio dell'età d'esordio o del tipo di terapia necessaria: *diabete mellito insulino-dipendente* (IDDM) o giovanile e *diabete mellito non insulino-dipendente* (NIDDM) o dell'adulto (2). Questa classificazione risultò ben presto poco utile, dato che non consentiva di classificare correttamente alcuni soggetti. La scoperta di altri tipi di diabete con specifica fisiopatologia, che non rientravano in questo sistema di classificazione, complicò ulteriormente la situazione. Immaginare che del diabete esistano delle forme *nuove* può apparire un'affermazione quanto meno azzardata, trattandosi di una malattia nota fin dall'antichità, molto diffusa nella popolazione generale e tra le più studiate. Tuttavia, il diabete non è una malattia singola, ma una sindrome piuttosto eterogenea che ne racchiude diverse forme, che nel corso degli anni ha necessitato di un continuo aggiornamento dei criteri di classificazione, il cui elevato tasso di obsolescenza è misura della rapidità e vastità i progressi delle conoscenze in questa materia.

L'ultima classificazione ufficiale del diabete mellito risale ad opera dell'American Diabetes Association (ADA) (3) si basa sull'eziologia della malattia stessa e identifica quattro forme principali di diabete: diabete tipo 1, diabete tipo 2, un gruppo eterogeneo che comprende tutte le forme di diabete secondario e il diabete gestazionale (Tab. 1).

Tabella 1. Classificazione eziologica del diabete secondo l'ADA.

Classe di diabete	Definizione	Sottotipi
Diabete tipo 1	Distruzione delle β -cellule pancreatiche, che conduce solitamente al deficit assoluto di insulina.	- Autoimmune - Idiopatico
Diabete tipo 2	Difetto di secrezione insulinica quasi sempre associato a insulino-resistenza	
Altri tipi specifici	Forme di diabete (escludendo il diabete tipo 1) a eziologia nota	- Difetti genetici della funzione β -cellulare - Difetti genetici dell'azione insulinica - Malattie del pancreas esocrino - Endocrinopatie - Indotto da farmaci o sostanze chimiche - Infezioni - Forme rare di diabete immuno-mediato - Altre sindromi genetiche occasionalmente associate a diabete
Diabete Gestazionale	Iperglicemia la cui insorgenza e/o diagnosi avviene durante gravidanza	

Il diabete mellito tipo 2, è la forma più comune di diabete, comprende un gruppo eterogeneo di alterazioni caratterizzate da un deficit per lo più parziale della secrezione insulinica, quasi sempre associato a insulino-resistenza dei tessuti periferici. L'eziologia di questo tipo di diabete non è ancora totalmente nota, anche se, come vedremo in seguito, giocano un ruolo importante sia la predisposizione genetica che alcuni fattori ambientali (scorretto stile di vita, sovrappeso/obesità). Si tratta, pertanto, di una forma di diabete potenzialmente prevenibile mediante modifiche dello stile di vita e che ha uno sviluppo graduale, spesso preceduto da minime alterazioni dell'omeostasi glucidica.

Dagli anni '70 ad oggi sono state avanzate varie proposte per i criteri diagnostici delle diverse categorie di tolleranza glucidica. Nel 1985 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (4) distinse le seguenti categorie:

- Normale tolleranza glucidica (NGT) per glicemia a digiuno <110 mg/dl,
- Alterata tolleranza glucidica (IGT) per glicemia alla seconda ora del carico orale di glucosio ≥ 140 mg/dl e <200 mg/dl,

- Diabete mellito tipo 2 per glicemia a digiuno ≥ 140 mg/dl (confermato in più rilevazioni), o glicemia alla seconda ora del carico orale di glucosio ≥ 200 mg/dl.

Successivamente, nel 1997, l'American Diabetes Association (ADA) propose alcuni cambiamenti (3) che vennero poi acquisiti anche dall'OMS nel 1998 (5):

- riduzione dei livelli glicemici a digiuno diagnostici per diabete da 140 mg/dl a 126 mg/dl (confermato in più rilevazioni),
- introduzione di una nuova categoria di alterata omeostasi glucidica, caratterizzata da livelli di glicemia a digiuno ≥ 110 mg/dl e < 126 mg/dl.

Ancora più recentemente l'ADA ha proposto un'ulteriore riduzione per i livelli di normalità della glicemia a digiuno, portandoli < 100 mg/dl. Tale variazione non è, però, stata recepita e fatta propria dalla Società Italiana di Diabetologia (SID) che adotta ancora il valore di 110 mg/dl.

Le classificazioni dell'OMS e dell'ADA individuano, quindi, una condizione intermedia fra la normale omeostasi del glucosio e il diabete. Questa condizione viene definita *alterata omeostasi del glucosio* (Impaired Glucose Regulation - IGR), ed è dall'ADA esplicitamente chiamata *pre-diabete*, intendendo con questo termine una condizione di rischio molto elevato per l'evoluzione verso il diabete tipo 2. Lo stato di pre-diabete comprende l'alterata glicemia a digiuno (Impaired Fasting Glucose - IFG), l'alterata tolleranza al glucosio (Impaired Glucose Tolerance - IGT) o entrambe le alterazioni (IFG+IGT). IFG e IGT sono due condizioni metabolicamente distinte in quanto hanno una diversa fisiopatologia (6). Al momento né IFG né IGT sono considerati entità cliniche proprie, ma sono categorie di rischio per lo sviluppo futuro di diabete e di patologie cardiovascolari (6).

2. Epidemiologia del diabete mellito tipo 2 e del pre-diabete

La prevalenza e l'incidenza del diabete mellito in tutti e cinque i continenti è aumentata drammaticamente negli ultimi decenni e si stima che il numero di soggetti affetti da questa patologia continuerà ad aumentare nel futuro prossimo (Fig. 1) (7). Le stime globali indicano una prevalenza di 194 milioni di diabetici noti, più un 50% di soggetti che, pur essendo affetti dalla malattia, non ne sono ancora venuti a conoscenza. Ancora meno incoraggianti sono le proiezioni al 2030, quando si stima che il numero di diabetici nel mondo sarà pari a 366 milioni con prevalenza del 4.4% contro il 2.2% calcolato nel 2000 (8).

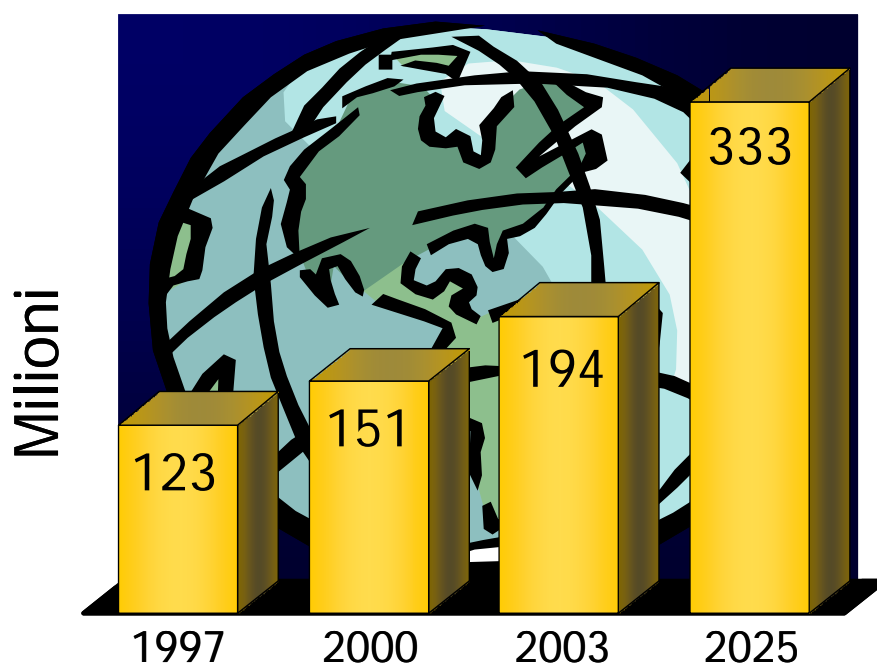


Figura 1. Prevalenza stimata del diabete tipo 2 nel mondo e proiezioni al 2025.

Le ragioni di questa "pandemia" sono molteplici e non tutte note. L'invecchiamento della popolazione può spiegare solo parzialmente questo fenomeno. Sicuramente un ruolo importante è giocato dal processo di "occidentalizzazione" dello stile di vita (Fig. 2), soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, legato alla crescente urbanizzazione, alla riduzione dell'attività fisica, all'eccessivo introito calorico e conseguente sviluppo di sovrappeso e obesità (9). In Cina e in India, ad esempio, si è registrato un rapido incremento di incidenza di diabete in relazione allo spostamento della

popolazione dalle campagne alla città: infatti, mentre nelle campagne cinesi l'incidenza di diabete tipo 2 è 0,1 - 2% nelle città raggiunge il 5%.



Figura 2. Variazioni delle abitudini alimentari e dello stile di vita che si sono verificate nell'ultimo secolo e che hanno favorito l'insorgenza di obesità e diabete.

Anche nei Paesi industrializzati, Italia inclusa, si registra un incremento di nuovi casi di diabete. Nel nostro paese si calcola che 2 milioni di persone hanno il diabete mellito, con un'incidenza annua di 150 mila nuovi casi, e che un altro milione non sa di averlo. La prevalenza di diabete è aumentata progressivamente dal 2,8% nel 1988 al 3,9% nel 2000 (10). Inoltre, stime derivate dallo studio di Brunico, prevedono che tra 10 anni si avrà un incremento netto di un milione di casi di diabete (11). L'incremento è tuttavia particolarmente evidente negli anziani, che rappresentano ora i 2/3 della popolazione diabetica.

Sulle stime e le proiezioni di prevalenza del diabete nei paesi occidentali incide il fenomeno sempre più diffuso dell'obesità infantile. Negli Stati Uniti, si calcola che il 20% dei bambini sia obeso e nella maggior parte dei casi presenta una o più alterazioni metaboliche caratteristiche della sindrome da insulino-resistenza.

La prevalenza del diabete tipo 2 è differente nelle varie regioni del globo, risultando più elevata in alcune isole del Pacifico, intermedia in Paesi come

L'India e gli Stati Uniti e relativamente bassa in Russia e Cina. Tale variabilità è probabilmente dovuta sia a fattori genetici che ambientali. Inoltre, vi è una considerevole variabilità nella prevalenza del diabete tra le diverse etnie all'interno di uno stesso Paese (per esempio, molto elevato (40%) tra gli Indiani Pima dell'Arizona). La prevalenza del diabete è circa due volte maggiore negli afro-americani e negli ispano-americani rispetto ai bianchi non ispanici; inoltre l'insorgenza del diabete tipo 2 avviene, in media, in epoca più precoce nei primi due gruppi che nella popolazione bianca non ispanica.

Il numero di persone affette da diabete aumenta con l'età della popolazione, con una incidenza variabile da 1.5%, negli individui tra i 20 e i 39 anni, al 20%, negli individui di età superiore a 75 anni. L'incidenza del diabete è simile per gli uomini e le donne delle diverse fasce d'età, anche se leggermente superiore negli uomini con più di 60 anni.

Analogamente al diabete, anche la prevalenza del pre-diabete è in forte espansione. IFG e IGT differiscono nella prevalenza e nella distribuzione all'interno della popolazione, anche perché rispecchiano condizioni metabolicamente differenti. Più o meno la metà delle persone con IFG hanno anche IGT e solo 20-30% in quelli con IGT mostrano anche IFG. Quindi, la concordanza delle due condizioni è parziale (6). Inoltre, in molte popolazioni prese in esame si è riscontrato che l'IGT è più prevalente dell'IFG (Tab. 2).

Tabella 2 Prevalenza di IGT e IFG in differenti popolazioni d'adulti.

Popolazione	Età	IGT (%)	IFG (%)	IGT/IFG (%)
Mauritius	25 – 74	13.9	4.2	3.3
Pima	≥ 15	10.7	1.9	2.5
Svezia	55 – 57	20.3	9.7	7.6
NHANES III	40 – 74	11.0	4.4	3.9
Australia	≥ 25	8.0	5.7	2.6
Hong Kong	18 – 66	6.1	0.9	1.1
DECODE	≥ 30	8.8	6.9	3.1

Oltre alla differenza nella prevalenza fra IGT ed IFG, occorre metter in luce anche una diversità tra le due classi a livello del fenotipo. Dati provenienti dal DECODE (Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe) e dal DECODA (Diabetes Epidemiology: Collaborative

analysis Of Diagnostic criteria in Asia) (12), indicano che la differenza più marcata e statisticamente significativa fra IGT e IFG consiste nel fatto che l'IFG sia più comune negli uomini piuttosto che nelle donne in tutte le fasce d'età, essendo tipicamente da 1.5 a 3 volte più frequente e giungendo a 7-8 volte negli europei tra 50 e 70 anni. Al contrario, la prevalenza dell'IGT è superiore nelle donne rispetto agli uomini di qualsiasi età eccetto nella popolazione asiatica sopra i 60 anni e in quella europea sopra gli 80 anni. Inoltre la prevalenza dell'IGT tende ad aumentare con l'età mentre l'IFG tende a raggiungere un plateau nei soggetti di mezza età (40 – 50 anni) e, negli uomini europei in particolare, subisce una riduzione nei soggetti più anziani.

Cambiamenti socio-ambientali e loro influenza sull'epidemia di diabete

Nelle ultime decadi si è registrata nella popolazione generale un'alterazione dell'equilibrio energetico con conseguente aumento della prevalenza di obesità, determinata dalla drammatica riduzione dell'attività fisica e da variazioni nelle abitudini alimentari. Infatti, lo stile di vita è radicalmente cambiato negli ultimi cinquant'anni a causa di una sempre maggiore urbanizzazione e del sempre più frequente uso di veicoli e macchine a motore (13). È stato dimostrato, inoltre, che il grado di urbanizzazione (ad esempio, l'alta densità di residenti e la disponibilità di trasporti) è inversamente associato all'abitudine di camminare o usare la bicicletta (14). Allo stesso tempo, le città offrono pochi spazi verdi ed opportunità per i bambini di giocare all'aria aperta, di conseguenza aumenta il tempo che essi trascorrono in casa utilizzando videogiochi o guardando la televisione (15).

Se da una parte la spesa energetica si è ridotta, dall'altra è aumentato l'introito calorico a causa di variazioni della natura stessa dei cibi, del sempre più frequente consumo di pasti fuori casa, e dell'esplosione della promozione e del marketing dei prodotti alimentari, associati ad una più facile reperibilità ed un più basso costo degli alimenti stessi (16). Al cambiamento delle abitudini alimentari hanno contribuito anche alcune variazioni nei costumi sociali. Ad esempio, è aumentato il numero delle famiglie in cui entrambi i genitori lavorano, con conseguente riduzione del tempo dedicato alla gestione della famiglia stessa e alla scelta degli alimenti. L'industria alimentare ha risposto a tali esigenze producendo e

promuovendo cibi convenienti, ricchi di calorie, spesso precotti (17). L'aumentato consumo di questi alimenti si è associato ad una riduzione del consumo di pesce, frutta e verdura. Inoltre, le dimensioni delle porzioni sono notevolmente aumentate nelle ultime due decadi (18), così come il consumo pro capite di zucchero e grassi (19). Questo tipo di alimenti è divenuto di facile accesso anche per i bambini, sia nel *fast food* sia a scuola, così come in casa (20). Si è osservato che i bambini che mangiano nei *fast food* assumono un maggior numero di calorie e consumano meno frutta e verdura rispetto ai bambini che non frequentano tali ristoranti (21-22). Studi osservazionali condotti in adolescenti fra i 12 e i 18 anni d'età, fra gli anni '70 e '90 (23-24), hanno evidenziato da una parte una riduzione della percentuale di introito calorico di cibo consumato a casa e dall'altro un aumento della quota introdotta mangiando fuori casa. La proporzione delle calorie totali assunta a casa si è ridotta da 74.1% nel 1971-78, a 68.3% nel periodo 1989-91 e a 60.5% nel 1994-96. Allo stesso tempo, la percentuale di cibo consumata presso i *fast food* è aumentata dal 6.5% al 16.7% nel periodo 1971-78 al 1989-91. Di conseguenza anche la quantità di denaro spesa per mangiare fuori casa è aumentata, passando dal 25% della spesa totale per il cibo nel 1977-1978 al 40% nel 1995 (25). Un fenomeno simile si è registrato anche in Italia, con un aumento di 58.1 miliardi di euro nel 2005, corrispondenti ad un incremento del 2.6% rispetto all'anno precedente. E' stato inoltre stimato che nel 2008 il cibo consumato fuori casa rappresenterà il 36% del totale (www.ISTAT.it). Mangiare fuori casa, compresi ristoranti e *fast food*, è associato ad un ridotto apporto macro/micro-nutrienti, ad una peggiore qualità della dieta, ad una più alta densità calorica delle pietanze che determina un conseguente aumento del peso corporeo (26-28). In due differenti studi, nelle donne che mangiavano abitualmente al ristorante/*fast food* si registrava un maggior introito di calorie, grassi totali e saturi, colesterolo e sodio (29-30). Inoltre, nei giovani adulti dello studio CARDIA, effettuato fra il 1985-1986 e il 2000-2001, il numero di accessi ai fast food risultava correlato con un aumento del peso corporeo e dell'insulino-resistenza, due dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di diabete tipo 2 (31).

3. Eziologia del diabete mellito tipo 2

Il diabete tipo 2 è una malattia poligenica e multifattoriale, caratterizzata dall'interazione fra un determinato corredo genetico e fattori acquisiti e/o ambientali.

Fattori genetici

La presenza di almeno 30.000 geni nel genoma umano e la caratterizzazione e l'identificazione di questi geni potrebbero contribuire ad affrontare con successo la sfida della comprensione delle malattie complesse su base genetica come il diabete. Le evidenze per una predisposizione genetica nella trasmissione del diabete tipo 2 derivano dall'osservazione che esiste un'aggregazione familiare della malattia. Il diabete tipo 2 può essere, quindi, considerato come malattia almeno parzialmente ereditabile, anche se la sua trasmissione non segue le leggi mendeliane.

Studi epidemiologici condotti su parenti di primo grado di pazienti diabetici e gemelli dizigoti, hanno evidenziato in questi soggetti un rischio relativo di sviluppare la malattia fra il 25% e il 38% (32), rischio che raddoppia se entrambi i genitori sono affetti da diabete (33). Di particolare interesse in tal campo sono gli studi condotti su gemelli monozigoti che condividono il 100% del patrimonio genetico e in cui la discordanza per diabete è una conseguenza dei fattori ambientali che agiscono sul genotipo. Nelle popolazioni europee è stato calcolato un tasso di concordanza per diabete tra il 28.6% e il 34%, che raggiunge il 58% negli studi con *follow-up* a 10 anni e il 96% a 15 anni. In tale osservazione deve essere considerato che l'incidenza del diabete aumenta con l'età, pertanto anche la concordanza per la malattia tra familiari aumenta parallelamente. Con l'avanzare dell'età, infatti, si assiste ad un progressivo deterioramento della tolleranza glucidica. Resta, tuttavia, dubbio se questo fenomeno rappresenti un naturale processo di invecchiamento oppure rispecchi una maggiore propensione a sviluppare una condizione patologica.

I dati epidemiologici prima citati sono, comunque, indicativi di una forte componente genetica nel determinismo del diabete tipo 2. Un difetto in un singolo gene, tuttavia, molto difficilmente può spiegare la maggioranza dei casi di diabete che sembrano, invece, legati a più geni mutati, nessuno

singolarmente in grado di dare la malattia, ma che insieme concorrono al suo sviluppo. Numerosi sono i geni candidati quali responsabili di tale disordine (34) e possono essere distinti in:

- geni che regolano la funzione β -cellulare pancreatica,
- geni che modulano la trasduzione intracellulare del segnale insulinico (insulino-resistenza),
- geni coinvolti in altri meccanismi biologici, in alcuni casi non ancora ben delucidati, ma che sicuramente modulano la regolazione dell'omeostasi glucidica.

Difetti di attivazione del recettore insulinico, ad esempio, sembrano rappresentare la più precoce anomalia in gran parte dei pazienti affetti da diabete tipo 2, ma mutazioni del gene che codifica per questo recettore sono state descritte solo in rari casi. Polimorfismi di *IRS (insulin receptor substrate)* (35) possono essere associati a ridotta tolleranza glucidica. *IRS-1* e *IRS-2* sono i primi intermediari al di là del recettore insulinico nella cascata dell'azione dell'insulina e giocano un ruolo chiave nella trasmissione del segnale insulinico, rispettivamente, nella muscolatura scheletrica e nel fegato.

Diversi studi hanno dimostrato che un'alterazione anche a carico del *PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ)* (36), un recettore ormonale nucleare che regola la lipogenesi, è responsabile dell'accumulo di lipidi nel tessuto adiposo, nel muscolo scheletrico e nel fegato favorendo quindi l'insulino-resistenza.

Al momento, però, le più recenti meta-analisi pubblicate sull'argomento hanno rilevato una scarsa predittività dei principali polimorfismi di geni candidati noti, a testimonianza della complessità del problema.

Fattori ambientali

Anche se la suscettibilità genetica gioca un ruolo importante nella regolazione dei parametri metabolici, la rapida crescita della prevalenza di diabete nel mondo registrata nelle ultime due decadi suggerisce che fattori ambientali (sociali, economici e culturali) abbiano determinato o, per lo meno, favorito questa condizione. Differenti elementi sembrano avere un ruolo importante nello sviluppo del diabete tipo 2, come lo stress ambientale e sociale, la malnutrizione nel periodo fetale, l'obesità, soprattutto di tipo centrale. Quest'ultima riveste sicuramente un ruolo di

primo piano dato che circa l'80% dei soggetti affetti da diabete tipo 2 è sovrappeso/obeso.

- a. Obesità Dati di fisiopatologia hanno dimostrato che i soggetti obesi sono frequentemente insulino-resistenti e presentano alterazioni dell'omeostasi glucidica (37). Inoltre, numerosi studi prospettici supportano l'associazione fra obesità e rischio di diabete. L'indice di massa corporea (Body Mass Index – BMI), utilizzato come misura del grado di obesità, si è rivelato un forte predittore di diabete sia negli uomini che nelle donne (Fig. 3) (38-42). Ad esempio, nel Nurses' Health Study (43-44), che ha coinvolto 121.700 donne, si è osservato che il rischio di diabete aumentava progressivamente con l'aumentare del BMI, a partire da un valore di BMI pari a 22 Kg/m². Infatti, le donne con BMI compreso fra 24 e 24.9 Kg/m² mostravano un rischio relativo di 5.0 (IC: 3.6-6.6) rispetto alle donne con BMI inferiore a 22 Kg/m², il rischio saliva a 40.3 (IC: 33.7-48.3) nelle donne con BMI ≥31 Kg/m², per raggiungere 93.2 (IC: 81.4-106.6) nella classe di BMI ≥35 Kg/m².

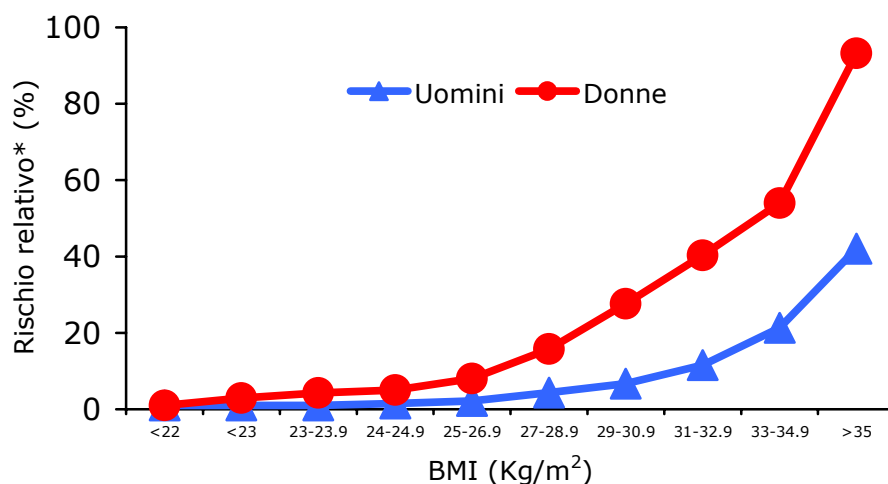


Figura 3. Relazione fra grado di obesità, espressa come BMI, e rischio di diabete tipo2.
*Rischio relativo corretto per l'età.

Non solo il grado di obesità, ma anche la distribuzione del grasso corporeo sembra influenzare lo sviluppo di diabete. Il grasso presente a livello viscerale risulta, infatti, metabolicamente più attivo di quello

sottocutaneo e sembra responsabile del maggior rischio di diabete presentato dai soggetti con obesità di tipo centrale (45). La misura della circonferenza vita, rispecchiando la quantità di grasso viscerale (46) (valutato mediante tomografia computerizzata), risulta uno strumento di facile applicabilità clinica per l'identificazione di soggetti esposti ad alto rischio di diabete. La sua validità in termini predittivi è stata dimostrata in numerosi studi. Ad esempio, nella stessa coorte di donne del Nurses' Health Study si è dimostrato che sia la circonferenza vita che il rapporto vita/fianchi erano predittori indipendenti di diabete tipo 2 (47). Nello studio Health Professionals Follow-Up Study (48), in una coorte di 51.529 uomini, sia il grado di obesità (valutata come BMI) che l'obesità viscerale (identificata dalla misura della circonferenza vita) erano in grado di predire la comparsa di diabete, ma la circonferenza vita appariva essere un predittore migliore rispetto al BMI e al rapporto vita/fianchi.

- b. Ridotta attività fisica La vita sedentaria aumenta il rischio di obesità e diabete tipo 2, come dimostrato dalla relazione esistente fra tempo trascorso guardando la televisione e obesità, aumento del peso corporeo e del rischio di diabete (Fig. 4) (49-50).

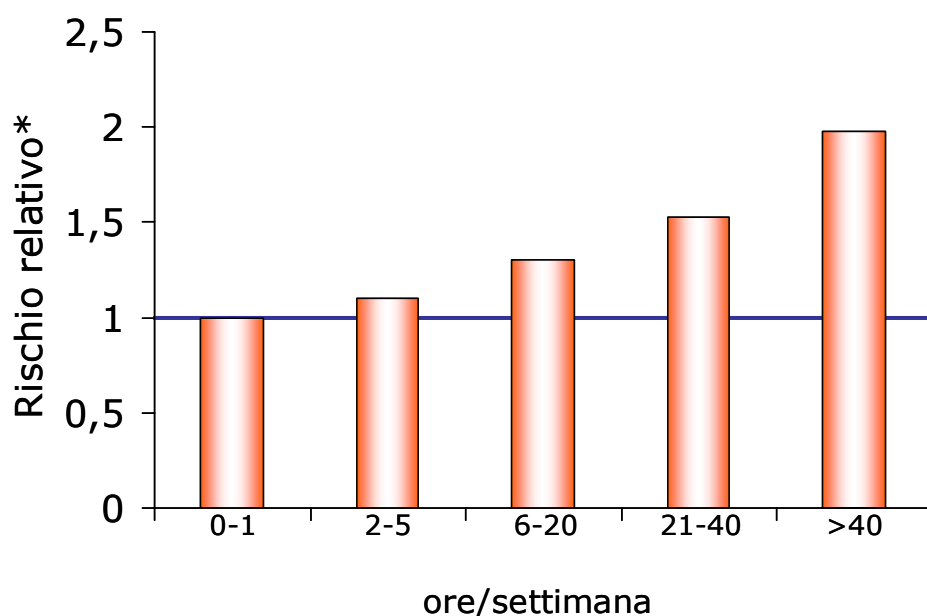


Figura 4. Rischio relativo di diabete tipo 2 in relazione al numero di ore trascorse a guardare la televisione nel Nurses' Health Study. *Rischio relativo corretto per l'età.

D'altra parte, numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono che praticare attività fisica comporta un ridotto rischio di diabete tipo 2 (51-55), indipendentemente da età, obesità e familiarità per tale malattia. Sebbene il rischio di diabete si riduca con l'aumentare dell'attività fisica, anche un esercizio di modesta entità, come può essere camminare per un'ora a settimana, si associa a una riduzione del rischio di diabete rispetto alla totale sedentarietà (56).

In una recente meta-analisi (57) è stata confermata un'associazione inversa fra attività fisica di moderata entità e rischio di diabete tipo 2. I soggetti che praticano regolarmente esercizio fisico moderato mostrano, infatti, un rischio di diabete del 30% più basso rispetto ai soggetti sedentari. L'effetto protettivo dell'esercizio fisico nei confronti dell'insorgenza del diabete tipo 2 è dovuta al miglioramento dell'insulino-sensibilità (58) e alla maggiore utilizzazione del glucosio da parte dei tessuti periferici (59).

- c. Dieta Sia la qualità che la quantità degli alimenti consumati possono contribuire allo sviluppo di diabete. Un aumentato introito calorico, naturalmente, favorisce lo sviluppo di sovrappeso/obesità e di conseguenza la comparsa di diabete. Una dieta a basso contenuto di fibre, ricca di alimenti con un indice glicemico elevato (60-62) o ricca in grassi (63-64) è stata associata ad un aumento del rischio di diabete.

Interazione gene-ambiente

Lo studio delle popolazioni migranti mette bene in evidenza l'interazione fra fattori genetici e ambientali. Si è visto che gruppi etnici emigranti presentano una prevalenza della malattia più alta non solo rispetto alla popolazione di origine, ma anche alla popolazione del nuovo paese, come per esempio si è verificato per gli Indiani d'Asia o gli Ebrei emigrati in USA (65).

Per spiegare questo fenomeno, è stata proposta l'ipotesi del genotipo frugale (*thrifty*), secondo la quale popolazioni che erano esposte a continue variazioni dell'apporto di cibo hanno selezionato un genotipo in grado di ottimizzare l'accumulo di scorte energetiche in periodi di abbondanza di cibo, permettendo a queste la sopravvivenza in periodi di ridotto apporto

calorico. Secondo questa ipotesi, il genotipo frugale determinerebbe una selettiva insulino-resistenza a livello muscolare che permetterebbe al muscolo di non bruciare tutte le energie in periodi di digiuno e di deviarle verso l'accumulo di grasso nei periodi di abbondanza (66). Gli aborigeni australiani, così come gli Indiani Pima, rappresentano un esempio classico di questo fenomeno: quando esposti ad una dieta *occidentale*, presentano un drammatico aumento della prevalenza di diabete che passa dallo 0.1% al 25%-40%.

Patologie predisponenti

- a. Diabete gestazionale Le donne con pregresso diabete gestazionale hanno un rischio di sviluppare diabete tipo 2 del 17-63% a 5-16 anni (67). Il rischio varia ampiamente nei differenti studi in rapporto a molteplici parametri come le modalità di diagnosi del diabete gestazionale e la durata del follow-up. Elevati valori di glicemia a digiuno durante la gravidanza sono buoni predittori del futuro sviluppo di diabete tipo 2, eccetto quando vengono considerati indici più specifici della funzione β -cellulare; altri fattori di rischio mostrano, invece, un potere predittivo ridotto o nullo dopo correzione per i parametri glucidici (68).
- b. Sindrome Metabolica La presenza di sindrome metabolica, condizione in cui sono contemporaneamente presenti molteplici fattori metabolici, aumenta il rischio sia di diabete tipo 2, triplicandolo, che di mortalità cardiovascolare (69). Le componenti chiave della sindrome metabolica sono: obesità addominale, dislipidemia aterogenica, alterata pressione arteriosa, insulino-resistenza (con o senza l'alterata tolleranza al glucosio), stato pro-infiammatorio e pro-trombotico. Esistono numerosi criteri diagnostici per la sindrome metabolica. Ognuno di essi identifica segmenti diversi della stessa popolazione generale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1999 ha presentato dei criteri diagnostici per la sindrome metabolica di difficile applicabilità clinica (70). Secondo tali criteri devono essere presenti due o più delle seguenti alterazioni:

- diagnosi di diabete, alterata tolleranza glucidica, alterata glicemia a digiuno o insulino-resistenza;
- ipertensione arteriosa: $\geq 140/90$ mmHg;

- dislipidemia: trigliceridi ≥ 150 mg/dl o colesterolo-HDL < 35 mg/dl negli uomini e < 39 mg/dl nelle donne;
- obesità centrale: rapporto vita/fianchi (WHR) $\geq 0,90$ negli uomini e $\geq 0,85$ nelle donne o BMI ≥ 30 kg/m²;
- microalbuminuria: escrezione urinaria di albumina ≥ 20 mg/min o rapporto urinario albumina-creatinina ≥ 30 mg/g.

I criteri che meglio si prestano a una immediata applicazione clinica sono quelli proposti dal National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) (71), secondo tale definizione per porre diagnosi di sindrome metabolica è necessaria la presenza di tre o più condizioni tra:

- obesità addominale: circonferenza vita > 102 cm negli uomini e > 88 cm nelle donne;
- trigliceridi ≥ 150 mg/dl;
- colesterolo-HDL < 40 mg/dl negli uomini e < 50 mg/dl nelle donne;
- pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg;
- glicemia a digiuno ≥ 110 mg/dl.

Nel 2006, i criteri dell'ATP III sono stati riesaminati e modificati dall'International Diabetes Federation (IDF) (72) con soglie diagnostiche decisamente più basse per obesità viscerale e glicemia a digiuno. Secondo i nuovi criteri imposti dall'IDF, per porre la diagnosi di sindrome metabolica è necessaria la presenza di obesità centrale (circonferenza vita ≥ 94 cm negli uomini Europei e ≥ 80 cm nelle donne Europee; con valori diversi nelle varie etnie) e due tra le seguenti condizioni:

- trigliceridi ≥ 150 mg/dl o terapia specifica;
- colesterolo-HDL < 40 mg/dl negli uomini e < 50 mg/dl nelle donne o terapia specifica;
- pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg o terapia anti-ipertensiva;
- glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl o precedente diagnosi di diabete mellito tipo 2.

Considerata la sua stretta connessione con insulino-resistenza e alterata omeostasi glucidica, non sorprende che la sindrome metabolica sia un importante fattore di rischio per il diabete tipo 2, tanto da essere essa stessa considerata uno stato di pre-diabete.

c. Sindrome dell'ovaio policistico La policistosi ovarica (PCOS) è stata

tradizionalmente considerata come la più comune malattia endocrina dell'età riproduttiva nella donna (prevalenza 6-10% della popolazione), ma solo recentemente sono stati riconosciuti gli aspetti metabolici ad essa associati ed in particolare il suo stretto legame con l'insulino-resistenza (73) e, conseguentemente, con il diabete tipo 2. Studi retrospettivi hanno mostrato una più alta prevalenza di diabete nelle donne in post-menopausa e storia di PCOS rispetto ad una popolazione di controllo di pari età (15% vs 2.3%) (74) e, successivamente, riconfermato in studi prospettici (75-76).

4. Patogenesi e storia naturale del diabete mellito tipo 2

Il mantenimento dell'omeostasi glucidica dipende da tre fondamentali meccanismi operanti in sintonia: la stimolazione della secrezione pancreatica di insulina, la soppressione insulino-mediata della produzione endogena di glucosio e la stimolazione insulino-mediata dell'utilizzazione periferica del glucosio.

Nel diabete mellito tipo 2 si riscontrano due alterazioni fisiopatologiche fondamentali: un difetto della secrezione insulinica, sia qualitativo che quantitativo, da parte della β -cellula, e l'insulino-resistenza dei tessuti periferici (fegato, muscolo e tessuto adiposo) (77). La concomitanza di insulino-resistenza e ridotta secrezione insulinica determinano un'alterata utilizzazione del glucosio a livello del tessuto muscolare, un'inadeguata modulazione della produzione endogena di glucosio ed un'aumentata mobilizzazione di acidi grassi da parte del tessuto adiposo (Fig. 5).

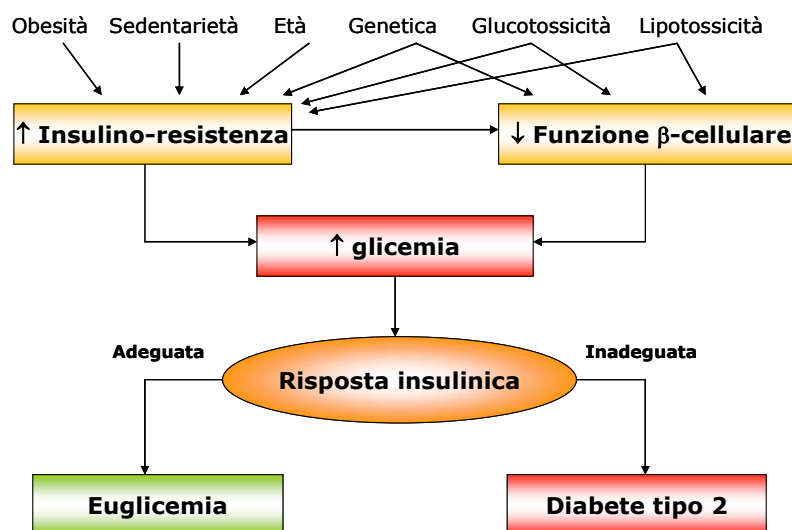


Figura 5. Patogenesi del diabete mellito tipo 2.

Nella popolazione dei diabetici tipo 2 esistono soggetti con prevalente insulino-resistenza e altri con prevalente deficit insulinico ma, nella maggior parte dei casi, i difetti coesistono (75%).

Insulino-resistenza

L'insulino-resistenza è una condizione pressoché universale nel paziente con diabete tipo 2 e rappresenta la risultante dell'interazione di fattori

genetici in gran parte poco noti e fattori ambientali (attività fisica, alimentazione, età...). L'obesità è un potentissimo moltiplicatore dell'insulino-resistenza e come tale è uno dei principali fattori predisponenti per il diabete tipo 2. La condizione di insulino-resistenza è spesso associata ad alterazioni metaboliche (alterata tolleranza al glucosio, ipertrigliceridemia e bassi livelli di colesterolo-HDL), obesità centrale (in particolare viscerale), ipertensione, microalbuminuria, disfunzione endoteliale, alterazioni del sistema coagulativo e fibrinolitico, iperuricemia, infiammazione (78) che confluiscono a configurare la sindrome metabolica (79). Il difetto dell'azione dell'insulina si esplica principalmente a livello dei tessuti periferici: muscolo e tessuto adiposo (Fig. 6).

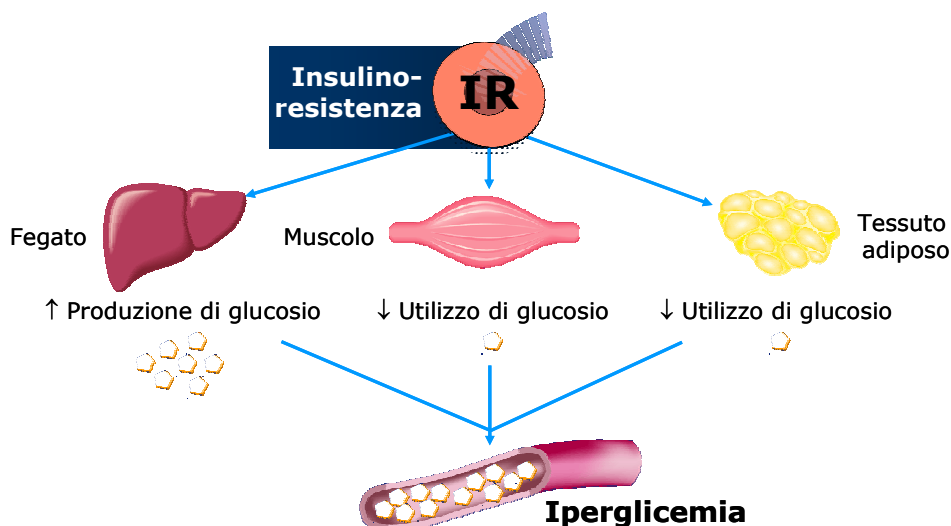


Figura 6. Conseguenze dell'insulino-resistenza a livello dei tessuti periferici.

A livello del primo la ridotta capacità dell'insulina di promuovere l'utilizzazione di glucosio ed il suo immagazzinamento sotto forma di glicogeno contribuisce all'iperglicemia della fase post-prandiale.

A livello del tessuto adiposo la resistenza all'insulina si traduce in una ridotta utilizzazione di glucosio ed in un aumento della lipolisi con elevazione degli acidi grassi liberi (FFA) circolanti. L'aumentato afflusso di acidi grassi contribuisce all'insulino resistenza a livello del tessuto muscolare (80). Elevate concentrazioni di FFA, insulino-resistenza epatica ed un eccesso relativo di glucagone comportano un'aumentata attività gluconeogenetica epatica che sostiene un eccesso di produzione di glucosio da parte del fegato in condizioni basali ed una mancata soppressione nelle

fasi post-prandiali.

Deficit di secrezione β -cellulare

Un certo grado di insulino-resistenza è presente già in fasi molto precoci della malattia, ma sarebbe la perdita della funzione secretoria il vero segna-passi della comparsa di intolleranza glucidica prima e di diabete manifesto poi. Infatti, una franca iperglicemia (diabete) non si manifesta fin quando non si sviluppa un difetto della secrezione insulinica. Nelle fasi iniziali della malattia diabetica, in risposta allo stato di insulino-resistenza, un compensatorio aumento della secrezione insulinica da parte delle β -cellule pancreatiche è in grado di mantenere nella norma i livelli circolanti di glicemia. Con il progredire della patologia, la secrezione pancreatica di insulina si riduce progressivamente, causando iperglicemia. Caratteristica è la perdita della prima fase di secrezione insulinica, evento che precede lo sviluppo del diabete tipo 2. La perdita della fase acuta di secrezione insulinica non è un semplice indicatore di precoce disfunzione della β -cellula, ma può rappresentare un meccanismo fisiopatologico determinante dell'iperglicemia dopo carico orale di glucosio e dopo il pasto. La mancanza di una rapida risposta all'introduzione di nutrienti si associa ad un'incompleta soppressione della produzione endogena di glucosio, con conseguente riduzione della tolleranza glucidica. Come risultato di queste alterazioni, si sviluppa iperglicemia post-prandiale (tipica nelle fasi iniziali della malattia) seguita più tardivamente da iperglicemia a digiuno. Il progressivo aumento della glicemia gioca un ruolo importante nel favorire la progressione dell' insulino-resistenza e del difetto di secrezione (glucotossicità) (81), venendosi così ad instaurare un circolo vizioso.

In ultima analisi possiamo affermare che il diabete mellito Tipo 2 rappresenta il risultato di alterazioni fisiopatologiche riscontrabili a livello di vari organi: insulino-resistenza a livello del tessuto muscolare e adiposo, ridotta secrezione insulinica a livello delle beta-cellule pancreatiche, produzione epatica di glucosio non più inibita dall'azione insulinica. Tutte queste alterazioni fisiopatologiche si embricano tra loro e sono alla base dello sviluppo e della progressione dell'iperglicemia e come tali rappresentano i principali "obiettivi" della terapia del diabete Tipo 2.

5. Pre-diabete: IFG vs IGT

La storia naturale del diabete tipo 2 è lenta e caratterizzata da alterazioni metaboliche che precedono la comparsa di iperglicemia conclamata (82) (Fig. 7). La fase, in cui sono presenti alcune alterazioni dell'omeostasi glucidica, ma i livelli glicemici sono sotto il *cut-off* stabilito per la diagnosi di diabete, viene definita pre-diabete. La definizione dei cut-off per diabete e pre-diabete ha creato accesi dibattiti nella comunità medica (83-84). Il pre-diabete include soggetti con alterazione della glicemia a digiuno (IFG), soggetti con alterate escursioni post-prandiali della glicemia (IGT) e soggetti che presentano entrambe le alterazioni.

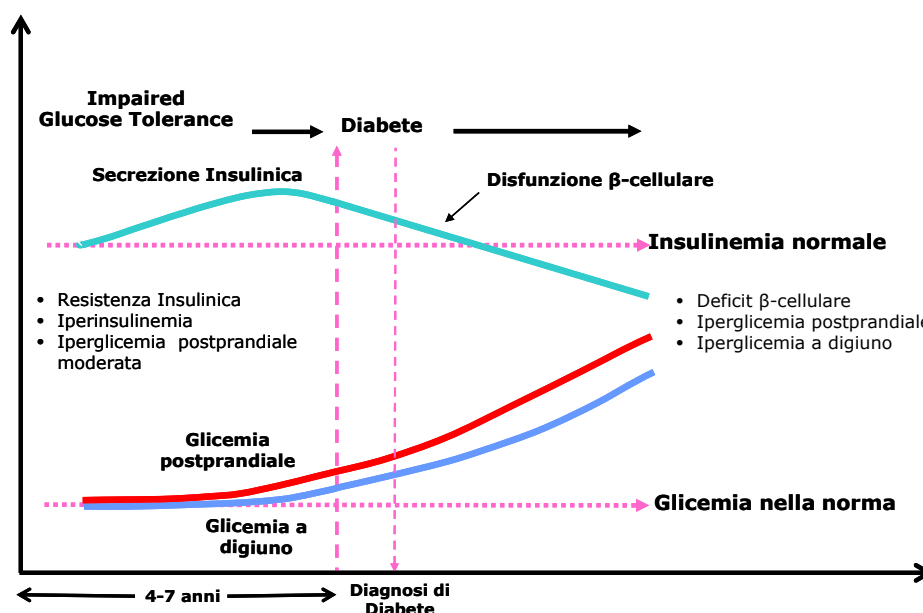


Figura 7. Storia naturale del diabete mellito tipo 2.

Studi epidemiologici che hanno confrontato la prevalenza di IFG e IGT hanno dimostrato che tali categorie definiscono due differenti popolazioni, solo parzialmente sovrapposte (6), poiché rispecchiano due condizioni distinte da un punto di vista metabolico, dato che i determinanti metabolici del digiuno e della fase post-prandiali sono differenti.

Sia l'IGT che l'IFG sono condizioni caratterizzate e legate all'insulino-resistenza, ma differiscono per il sito su cui si verifica la ridotta azione biologica dell'insulina. Infatti, mentre i soggetti IFG presentano insulino-resistenza prevalentemente epatica, associata ad una normale sensibilità a

livello muscolare, gli individui con IGT mostrano una insulino-sensibilità solo lievemente ridotta a livello epatico, ma più spiccata, di grado da moderato a severo, a livello del tessuto muscolare. I soggetti IFG+IGT sono, invece, caratterizzati da entrambe le forme di insulino-resistenza (85).

Anche il *pattern* di secrezione insulinica differisce nei vari gruppi. In particolare i soggetti con IFG isolato hanno una riduzione della prima fase di secrezione insulinica sia dopo infusione endovenosa (IVGTT) che dopo somministrazione orale di glucosio, ma la seconda fase di risposta all'OGTT è meno compromessa rispetto a quella dei soggetti con IGT. Questi ultimi hanno, invece, un severo deficit sia della fase precoce che tardiva della secrezione insulinica ad entrambi i test di stimolo (IVGTT e OGTT) (86).

Queste caratteristiche metaboliche consentono di spiegare il profilo glicemico che si ottiene dopo OGTT nelle differenti categorie di alterazione dell'omeostasi glucidica. Poiché la prima fase di secrezione insulinica gioca un ruolo importante sulla soppressione della produzione epatica di glucosio dopo OGTT o dopo un pasto (87), il difetto nella secrezione precoce dell'insulina nei soggetti con IFG e IGT altererà la soppressione della produzione epatica di glucosio, contribuendo all'eccessivo innalzamento della glicemia nei primi 60 minuti dell'OGTT. Nei soggetti con IGT, il concomitante deterioramento della fase tardiva di secrezione insulinica, associata all'insulino-resistenza a livello muscolare, determinerà una minore utilizzazione di glucosio durante l'OGTT, risultando in una permanente elevazione della glicemia a 120 minuti.

I soggetti con IFG partono da livelli glicemici a digiuno più elevati (a causa dell'insulino-resistenza epatica), raggiungendo concentrazioni plasmatiche di glucosio solo lievemente più alte dei soggetti normo-tolleranti a 30-60 minuti dal carico orale, per ritornare a valori simil-normali a 120 minuti. Questo profilo è spiegato da una normale sensibilità insulinica a livello muscolare (misurata mediante clamp) (88) e da una inalterata seconda fase di secrezione β -cellulare (valutata mediante dosaggio del c-peptide) che consentono di contenere l'elevazione della glicemia in risposta al carico orale di glucosio.

I soggetti IFG+IGT partono con elevati livelli di glicemia a digiuno che aumentano durante l'OGTT a causa dell'insulino-resistenza epatica e muscolare, associata ad un'alterata secrezione di insulina (89).

6. Identificazione dei soggetti a rischio di diabete

Il vertiginoso aumento della prevalenza del diabete di tipo 2 e delle complicanze d'organo ad esso associate rischia di determinare importanti effetti sull'aspettativa e sulla qualità di vita del singolo individuo con gravi ripercussioni per la società, per tale motivo una sempre maggiore attenzione viene posta nell'identificazione dei soggetti a rischio di diabete.

Il diabete è una condizione caratterizzata da un periodo silente o asintomatico di lunga durata, durante il quale può avere inizio lo sviluppo delle complicanze d'organo; basti pensare che al momento della diagnosi clinica il 20-30% dei casi può presentare complicanze microvascolari (90): nel 2-39 % retinopatia, nell'8-18% nefropatia, nel 5-13% neuropatia (91). La durata precisa del periodo di latenza non è nota, si ritiene che mediamente sia di 4-7 anni con punte di 10-12 anni. In accordo con tali dati, lo screening di una popolazione potrebbe anticipare la diagnosi clinica del diabete di 5-6 anni.

Il diabete progredisce attraverso stadi ben distinguibili: l'iperglicemia post-prandiale (IGT) può essere la prima alterazione evidenziabile, successivamente si può riscontrare una iperglicemia a digiuno (IFG). Negli stadi iniziali la malattia è difficilmente identificabile, ma appropriati test di screening, come questionari, dosaggio della glicemia plasmatica a digiuno e l'eventuale esecuzione di una curva da carico orale di glucosio (OGTT) possono consentire di identificare soggetti con alterata regolazione glucidica (ARG), ad alto rischio di sviluppare diabete.

Screening per il diabete

Le attuali evidenze suggeriscono che più che lo screening universale di popolazione è raccomandabile uno screening opportunistico (cioè eseguito in occasione dell'esecuzione di altri esami clinici) o selettivo nei soggetti ad alto rischio. Questo tipo di screening dovrebbe essere considerato nei soggetti di età >45 anni e fortemente raccomandato in quelli di età >45 anni e sovrappeso ($BMI \geq 25 \text{ Kg/m}^2$). Lo screening dovrebbe essere preso in considerazione anche nei soggetti con meno di 45 anni e sovrappeso che abbiano altri fattori di rischio, come un familiare di primo grado con diabete o pregresso diabete gestazionale, ma anche negli individui che appartengano ad un gruppo etnico a rischio o risultino ipertesi o

dislipidemici (92). Va sottolineato che i sistemi di attribuzione del rischio, prima di essere applicati su larga scala, dovrebbero essere testati e validati nelle popolazioni dove verranno impiegati. Lo screening negli individui ad alto rischio potrebbe non solo ridurre i costi, ma anche elevare il valore predittivo positivo del test di screening e restringerne l'esecuzione ad un gruppo selezionato della popolazione veramente a rischio di avere la malattia.

L'identificazione precoce del diabete potrebbe permettere al clinico di offrire una serie di interventi da attuare nella fase di pre-diabete, quali lo stretto controllo glicemico, l'uso più intensivo e mirato di farmaci antiipertensivi, l'impiego più aggressivo di ipolipemizzanti ed aspirina, l'impiego di programmi per modificare lo stile di vita e la cessazione del fumo di sigaretta. Evidenze dirette dimostrano che molti di tali interventi sono capaci di migliorare gli esiti quando intrapresi dopo la diagnosi clinica. L'entità di benefici aggiuntivi nel caso di un loro più precoce inizio, durante la fase pre-clinica, dovrebbe essere estrapolata da evidenze indirette. Gli effetti ottenibili da un inizio precoce di tali interventi dipendono dall'entità della riduzione del rischio assoluto delle complicanze verso cui sono indirizzati gli interventi. L'impatto di un precoce intervento, come uno stretto controllo della glicemia, al fine di ridurre la cecità, l'insufficienza renale avanzata, o le amputazioni agli arti inferiori, che si verificano di fatto solo 15 anni dopo la diagnosi, resta da dimostrare. Al contrario, l'impatto di intervenire precocemente con un controllo intensivo della pressione arteriosa avendo come bersaglio le malattie cardiovascolari, appare più consistente nei primi dieci anni dalla diagnosi. Considerando una serie di assunzioni, il numero di individui da sottoporre a screening (NNS) per prevenire, nell'arco di 5 anni, un caso di cecità in un occhio è 4300 attuando uno stretto controllo glicemico, mentre un NNS di 900 risulta necessario per prevenire un evento cardiovascolare se si attua uno stretto controllo della pressione arteriosa, sempre nei pazienti di nuova diagnosi (93). Un ulteriore aspetto dello screening del diabete che dovrebbe essere affrontato in studi controllati riguarda le conseguenze dal punto di vista etico, psicologico e sociale ed il rapporto costo-beneficio.

Soggetti a rischio

L'ADA (94) suggerisce di effettuare lo screening per il diabete tipo 2 in tutti

i soggetti considerati ad alto rischio, ovvero in coloro che presentano una o più delle seguenti caratteristiche:

- Età ≥ 45 anni,
- Sovrappeso corporeo ($BMI \geq 27 \text{ kg/m}^2$),
- Familiarità positiva per diabete (parenti di primo o secondo grado),
- Ipertensione arteriosa (valori pressori $\geq 140/90 \text{ mmHg}$),
- Storia di diabete gestazionale o macrosomia fetale ($\geq 4 \text{ kg}$),
- Appartenenza a un gruppo etnico ad alto rischio (ispanici, asiatici, africani),
- Precedente riscontro di IFG o IGT,
- Livelli di colesterolo HDL $\leq 35 \text{ mg/dl}$ e/o livelli di trigliceridi $\geq 250 \text{ mg/dl}$,
- Sindrome dell'ovaio policistico.

Inoltre, poiché l'incidenza del diabete di tipo 2 è in aumento anche nei bambini e negli adolescenti, lo screening del diabete andrà esteso anche a questa fascia di età. In particolare andrà effettuato a partire dal 10° anno di età nei soggetti sovrappeso (definito $BMI > 85^\circ$ percentile x età e sesso, peso x altezza $> 85^\circ$ percentile o peso $> 120\%$ del peso ideale (50° percentile) x altezza) con uno o più fattori di rischio tra:

- storia familiare positiva per diabete di tipo 2.
- appartenenza a gruppi etnici ad alto rischio,
- presenza di segni o condizioni associate ad insulino-resistenza (acanthosis nigricans, ipertensione, dislipidemia, sindrome dell'ovaio policistico).

Test di screening

Generalmente per la diagnosi di diabete vengono impiegate due metodiche: una basata sulla glicemia alla seconda ora del carico glucidico (2-h PG) e l'altra sulla glicemia a digiuno (FPG). I valori limite per la diagnosi di diabete sono: 200 mg/dl per 2-h PG, 126 mg/dl per FPG (3) (Tab. 3). Entrambi i tests necessitano di essere confermati. Anche l'emoglobina glicata A1c (HbA1c) è stata proposta come terzo test di riferimento per la diagnosi di diabete, sebbene attualmente non si utilizza a tal fine. Non è chiaro quale test e valore limite sia in grado di predire meglio lo sviluppo delle complicanze. Tutti e tre i test (2-h PG, FPG e

HbA1c) sono capaci di predire lo sviluppo di eventi cardiovascolari in modo lineare senza che possa essere identificato un valore soglia.

- a. Glicemia a digiuno. Una corretta misurazione della glicemia richiede che il soggetto sia a digiuno da almeno otto ore. Come metodica in sé, la FPG rispetto alla 2-h PG appare più conveniente per il paziente, più riproducibile, meno costosa e di più facile esecuzione.
- b. OGTT. Il test viene eseguito somministrando per via orale al soggetto 75 g di glucosio disciolto in acqua praticando due prelievi ematici per la valutazione della glicemia a digiuno e dopo 2 ore all'assunzione di zucchero. Valori glicemici ≤ 140 mg/dl sono indicativi di una normale tolleranza glucidica, mentre una glicemia compresa tra 140 mg/dl e 190 mg/dl è definita IGT; la diagnosi di diabete viene confermata per valori di glicemia ≥ 200 mg/dl. L'accuratezza di entrambi i test può risultare compromessa dalla mancata aderenza del soggetto al periodo di digiuno. Se la FPG è utilizzata come unico test per lo screening e la diagnosi di diabete, un caso su tre sarà classificato erroneamente come non-diabetico, quindi non verrà trattato. Di conseguenza, la FPG non può essere raccomandata come unico test di screening, ma dovrebbe essere combinata all'OGTT in gruppi selezionati.

Una strategia a fasi successive, con l'impiego della glicemia in tutti gli individui e dell'OGTT in quelli con IFG, porterebbe all'identificazione dell'82% dei soggetti con diabete non diagnosticato e del 29% di quelli con ridotta tolleranza ai carboidrati (IGT).

Oltre alla glicemia a digiuno e alla 2-h PG sono stati proposti come metodi di screening anche la glicemia random, la glicosuria e l'emoglobina glicata (HbA1c), così come l'uso di questionari.

- c. Glicemia casuale. Lo screening mediante la glicemia casuale o random è semplice per il soggetto e può essere praticato nell'ambulatorio del medico. A causa dei problemi di standardizzazione e della relativamente bassa specificità e sensibilità, la glicemia random da sola appare di limitata utilità come test di screening del diabete.
- d. Glicosuria. Anche la misura della glicosuria mediante stick è stata spesso impiegata come test di screening. Le urine possono essere analizzate a digiuno, a caso (urine spot) o in fase post-prandiale. In tutti i casi la sensibilità è bassa (16-64%), il valore predittivo positivo è 11-37% (stimando una prevalenza del diabete tra 6% e 12%) (95).

Quindi la glicosuria non dovrebbe essere utilizzata come metodo di screening del diabete, infatti da due a tre su otto individui con diabete potrebbero essere classificati erroneamente come non-diabetici. Inoltre, tra quelli con diabete, solo il 2% presenta glicosuria.

- e. Emoglobina glicata. Non esistono studi che hanno esaminato l'utilità dell'HbA1c nel predire lo sviluppo di diabete. La misura dell'HbA1c potrebbe essere di grande valore in un processo di screening a fase successive come misura di iperglicemia cronica, dal momento che contiene informazioni sia sulla glicemia a digiuno che post-prandiale. L'uso combinato di HbA1c e glicemia casuale o FPG potrebbe risultare utile per identificare i soggetti da sottoporre a OGTT.
- f. Questionari. Sono stati sviluppati numerosi questionari per identificare soggetti ad alto rischio di sviluppare diabete o con diabete non noto. Ciò è stato possibile grazie agli studi epidemiologici che hanno permesso di identificare i fattori di rischio correlati con lo sviluppo del diabete. Fra questi i più importanti e noti sono quelli proposti dall'ADA: età, predisposizione familiare, obesità, attività fisica, sesso, ipertensione, pregresso diabete gestazionale (96). I questionari hanno un elevato valore predittivo, offrendo la possibilità di identificare il 70-80% degli individui con diabete non noto, inoltre permettono di ridurre la misurazione della glicemia al 20-25% della popolazione.
- g. Algoritmi di rischio. Il rischio di diabete, come è noto, non dipende da un singolo fattore ma da una multifattorialità eziopatogenetica. Inoltre, l'effetto combinato di più fattori di rischio è di tipo moltiplicativo e non semplicemente additivo. Il calcolo del *risk score* si basa sul peso dei singoli fattori di rischio connessi con lo sviluppo del diabete e, rispetto ai metodi abitualmente utilizzati per assegnare le classi di rischio (metodica sì/no), permette una quantificazione ed una stratificazione del rischio di ogni singolo individuo di sviluppare DM. Nella tab. 3 sono riportati alcuni esempi di studi effettuati allo scopo di individuare i fattori di rischio che hanno un maggior valore predittivo.

Tabella 3. Principali algoritmi per identificare i soggetti a (9)rischio di diabete.

Studio	Fattori di rischio	Risk Score & probabilità		Sensibilità %	Specificità %	PPV %
FINDRISC* (97)	Età,Circonferenza vita, BMI, Familiarità, Uso di farmaci antiipertensivi, Iperglicemia, Esercizio fisico, Consumo frutta e verdura/die	<7 basso 7-11 appena elevato 12-14 moderato 15-20elevato >20 molto elevato		73	83	16
SCHULZE ** (98)	Età, Circonferenza vita, Altezza, Uso di farmaci antiipertensivi, Consumo carne rossa, Consumo di pane, Consumo moderato alcool, Consumo caffè, Sports, Ex fumatore o fumatore	<422 423-492 493-533 534-585 586-657 ≥658	<1 1-<2 2-<3 3-<5 5-<10 ≥10	67,5	81	7,7
IGLOO** (99)	Età, Circonferenza vita, Uso di farmaci antiipertensivi, Iperglicemia,Spor ts, Consumo di frutta e verdura, Diagnosi di sme metabolica, Fattori di rischio CV	Cut-off ≥9 elevato		78	76	7-12
*valuta il rischio di diabete a 10 anni						
**valuta il rischio di diabete a 5 anni						

7. Fattori di rischio emergenti

La prevenzione delle malattie, compreso il diabete mellito tipo 2, fonda le sue basi sull'identificazione di una serie di elementi (fattori di rischio) la cui presenza e intensità si associa con il rischio di sviluppare la malattia stessa. I fattori di rischio, ampiamente diffusi nella popolazione, agiscono in un continuum di rischio progressivamente crescente e sembrano potenziarsi a vicenda. Studi osservazionali hanno, infatti, dimostrato che il rischio globale di un individuo in cui coesistono più fattori di rischio è la conseguenza di una relazione esponenziale e non puramente additiva. Di conseguenza, risulta rilevante il vantaggio che si può ottenere dalla concomitante correzione di più fattori di rischio. Ampi studi epidemiologici e clinici hanno consentito di individuare i principali fattori di rischio per il diabete, in grado di promuovere i processi biochimici alla base della comparsa della malattia e di favorirne la progressione. Ai fattori di rischio *non-modificabili* quali età, sesso e fattori genetici, si affiancano i fattori di rischio *modificabili* quali obesità, soprattutto viscerale, abitudini alimentari e stile di vita. Tuttavia, per una migliore identificazione dei soggetti a rischio di diabete, l'attenzione dei ricercatori si è rivolta su altri fattori, definiti *emergenti*.

Marker dell'infiammazione

L'infiammazione cronica di basso grado potrebbe costituire parte di un *background* comune sia a patologie metaboliche come l'obesità (100), la sindrome metabolica e il diabete mellito tipo 2 (101), che a patologie cardiovascolari (102). Infatti, non solo l'infiammazione è stata correlata alla presenza di tali condizioni patologiche, ma recenti studi ne hanno evidenziato le potenzialità nel predire lo sviluppo di patologie cardiovascolari e diabete.

Il diabete mellito di tipo 2 è dovuto alla coesistenza di almeno due difetti patogenetici: l'insulino-resistenza e l'alterata secrezione insulinica. Una serie di condizioni favorenti lo sviluppo di queste alterazioni, come l'obesità e l'infiammazione (103) ad esempio, possono costituire un momento patogenetico importante nello sviluppo di diabete. L'accumulo di tessuto adiposo, soprattutto nella regione addominale, può contribuire allo sviluppo del diabete sia mediando il metabolismo degli acidi grassi che attraverso la

secrezione di adipochine e citochine che intervengono in svariati processi quali la regolazione dell'appetito, l'insulino-sensibilità, l'infiammazione e l'aterosclerosi. Alcune di queste citochine, contribuendo all'istaurarsi di un processo infiammatorio di basso grado, possono promuovere l'insulino-resistenza, e quindi favorire lo sviluppo di diabete, mediante numerosi meccanismi. Ad esempio, l'IL-6, una citochina pro-infiammatoria prodotta sia dal tessuto adiposo, che da cellule endoteliali, macrofagi e linfociti, potrebbe interferire con il segnale insulinico mediante l'induzione di proteine che si legano con il recettore dell'insulina (104). L'IL-6 inibisce anche l'attività della lipoprotein-lipasi con aumento della concentrazione di acidi grassi liberi (FFA); la dislipidemia che si crea contribuisce all'insulino-resistenza (105). Inoltre, l'IL-6 stimola la secrezione delle maggiori citochine infiammatorie come l'IL-1 e il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). Quest'ultimo, a sua volta, riduce l'*up-take* di glucosio insulino-mediato e promuove la disfunzione endoteliale (106).

Una delle prime osservazioni relative all'esistenza di una relazione fra marker dell'infiammazione e rischio di diabete fu pubblicata nel 1999 da Schmidt et al. (107), aprendo così la ricerca sulla possibile utilità di alcuni marcatori dell'infiammazione come indicatori biologici utili per l'identificazione di soggetti a rischio di diabete. Nello studio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities), dopo 7 anni di follow-up, si osservava che l'incidenza di diabete risultava associata alla presenza di elevati livelli di leucociti e fibrinogeno e a bassi livelli di albuminemia, anche dopo correzione per altri fattori di rischio (età, genere, etnia, glicemia, familiarità per diabete, attività fisica e fumo). Solo successivamente, sono stati presi in considerazione marcatori più sofisticati, come la PCR e l'IL-6. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione fra elevati livelli di PCR e patologia cardiovascolare e sindrome metabolica (incluse le sue caratteristiche componenti, come l'adiposità viscerale, l'iperinsulinemia e l'insulino-resistenza, l'ipertrigliceridemia e i bassi livelli di colesterolo HDL) (108-110). In tempi più recenti, diversi studi hanno mostrato l'esistenza di una relazione fra PCR e rischio di diabete. Nel Women's Health Study (111), ad esempio, il rischio relativo di comparsa di diabete nelle donne del quartile più alto dei marker infiammatori, rispetto al più basso, risultava 15.7 (IC: 6.5-37.9) per la PCR e 7.5 (IC: 3.7-15.4) per l'IL-6. L'associazione positiva

permaneva anche dopo aggiustamento per BMI, familiarità per diabete, fumo, attività fisica, consumo di alcool e terapia ormonale sostitutiva. Dati analoghi si riscontrano nel West of Scotland Coronary Prevention Study (WESCAPS) (112) in cui gli uomini caratterizzati dai più alti livelli di PCR (IV quartile: PCR > 4.18 mg/l) presentavano un rischio di diabete tre volte più alto rispetto a coloro che avevano i livelli più bassi (I quartile: PCR < 0.66 mg/l); la significatività statistica si manteneva anche dopo aggiustamento per i fattori di rischio comunemente impiegati nella pratica clinica, come BMI, trigliceridi e glicemia. Tali risultati sono stati confermati da un successivo studio finlandese che rilevava, dopo un follow-up di 11 anni, che i soggetti con valori di PCR ≥ 3 mg/l presentavano un rischio maggiore di sviluppare diabete (OR: 4.1; IC: 2.1-8.0) rispetto ai soggetti con livelli di PCR ≤ 1 mg/l; questa relazione persisteva anche dopo correzione per stile di vita e sensibilità insulinica (OR: 2.3, IC: 1.0-1.5) (113). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche nella popolazione giapponese (114).

Il Nurses Health Study ha dimostrato che anche altri marcatori dell'infiammazione sono importanti fattori predittivi indipendenti dello sviluppo di diabete; infatti il rischio relativo di sviluppare la malattia, dopo aggiustamento per globuli bianchi, PCR, insulinemia o Hb A1c, risultava 5.43 (IC: 3.47-8.5) per E-selectina, 3.56 (IC: 2.28-5.58) per ICAM-1, 1.12 (IC: 0.76-1.66) per VCAM-1 (115).

Nell'Insulin Resistance Atherosclerosis Study (116), i livelli basali di fibrinogeno, PCR e plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) risultavano più elevati nei soggetti che sviluppavano diabete nei 5 anni di follow-up. Come mostrato nella figura 8, l'incidenza di diabete aumentava in modo lineare e significativo con l'incremento dei livelli di PCR e PAI-1.

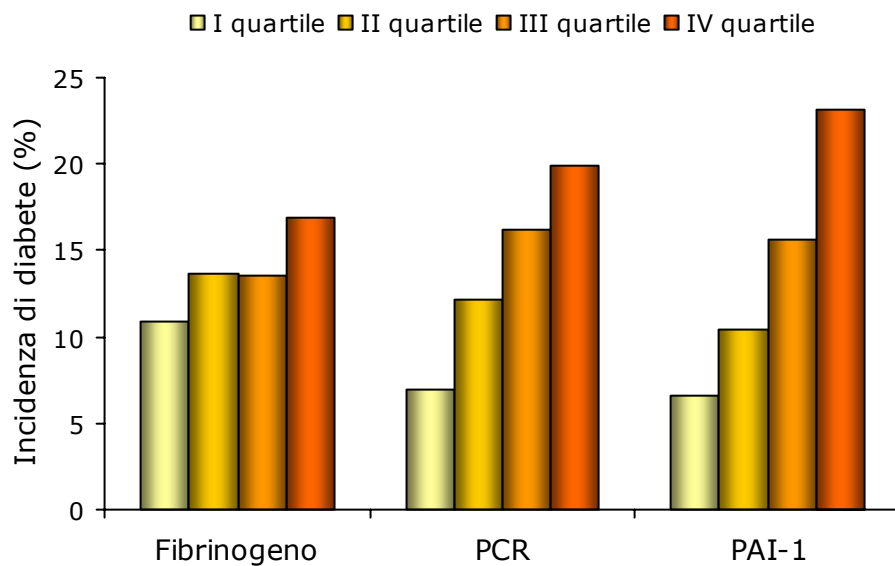


Figura 8. Incidenza di diabete tipo 2, stratificata per quartili di proteine infiammatorie, nell'Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Valore di p per fibrinogeno 0.06; p per PCR e PAI-1 0.001.

L'associazione risultava valida sia negli uomini che nelle donne, sia nei soggetti magri che in quelli obesi, indipendentemente dalla razza. Tuttavia l'associazione fra sviluppo di diabete e marcatori dell'infiammazione, risultava in questo ed in altri studi (117), notevolmente attenuata quando i dati venivano corretti per BMI e insulino-resistenza, suggerendo che il grasso corporeo e l'insulino-resistenza fossero parziali mediatori di tale relazione. Al contrario, l'associazione fra PAI-1 e incidenza di diabete risultava particolarmente stretta ed indipendente da altri fattori di rischio noti, come età, BMI, familiarità, attività fisica. Questo potrebbe indicare che il PAI-1, seppur notoriamente correlato all'insulino-resistenza e all'adiposità viscerale (118-120), potrebbe essere un marker molto precoce di insulino-resistenza e di conseguenza di diabete tipo 2. Infatti, in una popolazione ad alto rischio di diabete come quella del Framingham Offspring Study, i livelli di PAI-1 risultavano correlati alle concentrazioni di insulina sia nei soggetti con normale tolleranza glucidica che in quelli con alterata tolleranza (121), suggerendo che le alterazioni fibrinolitiche comunemente osservate in questi stati metabolici siano legate all'insulino-resistenza.

Recentemente, è stato valutato il ruolo di un altro fattore prodotto dal tessuto adiposo, l'adiponectina, nella modulazione del processo infiammatorio e della sensibilità insulinica. Questa proteina, che svolge

attività anti-infiammatoria e insulino-sensibilizzante (122), risulta ridotta nei soggetti obesi e nei pazienti diabetici (123). Studi nelle scimmie rhesus, che costituiscono un ottimo modello di obesità e diabete mellito tipo 2 umano, hanno confermato questi risultati e fornito evidenze che i livelli di adiponectina si riducono parallelamente alla progressione dell'insulino-resistenza e del diabete tipo 2 (124). Sulla base di questa osservazione si è ipotizzato che bassi livelli di adiponectina potessero costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di diabete. Una prima conferma si ebbe in una popolazione ad alto rischio, gli Indiani Pima, in cui fu evidenziato che la riduzione dei livelli di adiponectina costituiva, dopo 4-6 anni di follow-up, un fattore di rischio indipendente per la progressione a diabete, anche dopo correzione per età, genere, glicemia a digiuno e due ore dopo carico di glucosio, insulinemia e circonferenza vita (125). Risultati analoghi sono stati successivamente confermati da altri studi, in differenti etnie (126-130). Lo studio ARIC, ad esempio, dimostrava che i soggetti con livelli di adiponectina nel più alto quartile presentavano una riduzione del 40% del rischio di sviluppare diabete rispetto ai soggetti nel quartile più basso. Questa associazione protettiva era simile negli uomini e nelle donne, negli africani-americani come nei bianchi e nelle differenti categorie di BMI. Una simile percentuale di riduzione del rischio di diabete per i soggetti con livelli di adiponectina nel più alto terzile (HR: 0.44; IC: 0.28-0.70; p trend 0.0007). è stata evidenziata, dopo 18 anni di follow-up, anche da un ampio studio tedesco, recentemente pubblicato (131). La correzione per BMI, fumo, attività fisica, consumo di alcool, ipertensione, storia di infarto del miocardio e colesterolo totale, attenuavano debolmente tale associazione che perdeva, però, di significato statistico quando nel modello veniva inserito il valore di colesterolo HDL (HR: 0.81; IC: 0.50-1.33; p trend 0.4).

Enzimi epatici

L'emergente pandemia di obesità ha portato alla luce un crescente numero di conseguenze metaboliche ad essa associate, come dislipidemia, ipertensione, diabete mellito tipo 2 e patologie cardiovascolari (132). Più recentemente, l'obesità è stata associata anche ad altre alterazioni come l'epatosteatosi non alcolica (NASH) (133-134). Tale alterazione della funzionalità epatica, legata alla presenza di insulino-resistenza, può contribuire allo sviluppo di diabete (135). Il fegato, infatti, gioca un ruolo

centrale nel metabolismo glucidico e nella clearance dell'insulina (136). La perdita dell'effetto diretto di soppressione che l'insulina esercita a livello epatico sulla gluconeogenesi e sulla glicogenolisi, può determinare un aumento della produzione epatica di glucosio (137). La NASH si caratterizza per l'elevazione dei livelli circolanti di aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e γ -glutamyl-transferasi (GGT) (133, 138). Tradizionalmente, elevati livelli di enzimi epatici sono stati interpretati come marker di abuso d'alcool o di danno epatico (139-140). Studi osservazionali, hanno evidenziato che elevati livelli di ALT risultano associati con la presenza di epatosteatosi (135) e insulino-resistenza (141-142). Nell'Insulin Resistance Atherosclerosis Study (143), i livelli basali di AST e ALT sono risultati positivamente correlati con livello di insulinemia a digiuno ($r=0.22$ e $r=0.35$, rispettivamente), circonferenza vita ($r=0.18$ e $r=0.34$, rispettivamente) e glicemia a digiuno ($r=0.13$ e $r=0.29$, rispettivamente), ed inversamente correlati con un indice di insulino-sensibilità ($r=-0.18$ e $r=-0.30$, rispettivamente). Un aumento delle ALT potrebbe, quindi, riflettere un cambiamento fisiopatologico che predispone allo sviluppo di diabete tipo 2. Infatti, nello stesso studio, in un'analisi aggiustata per età, sesso, etnia e consumo di alcool, i partecipanti con AST (OR: 1.73; IC: 1.17-2.57) e ALT (OR: 2.32; IC: 1.36-3.75). nel più alto quartile presentavano un più alto rischio di sviluppare diabete rispetto ai soggetti con valori di enzimi epatici nei quartili più bassi. Altri studi hanno confermato l'esistenza tale associazione. Alla fine degli anni '80, Ohlson et al. (144) dimostrarono che ALT prediceva la comparsa di diabete in una coorte di uomini svedesi del 1913. Nello studio CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Adults) (145) i soggetti nel più alto quartile di AST presentavano un rischio di diabete significativamente più elevato. Sia ALT che AST risultavano indipendentemente associate alla comparsa di diabete in un gruppo di uomini Coreani (146), al contrario di quanto si evidenziava in uno studio condotto in uomini giapponesi (147). Infine, dati elaborati dallo studio WOSCOP (148) hanno mostrato che i soggetti con livelli di ALT nel quartile più alto (≥ 29 U/L) presentavano un più alto rischio di sviluppare diabete (HR: 3.38; IC: 1.99-5.73), indipendentemente da età, BMI, trigliceridi, HDL, pressione arteriosa sistolica, glicemia ed introito alcolico.

Recentemente, l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata anche un altro enzima epatico, GGT che è stato correlato con i fattori di rischio cardiovascolare (149), la sindrome metabolica (135), l'insulino-resistenza (150) e il diabete tipo 2 (DM2) (151-154) ed è stato proposto come marker di stress ossidativo (155). GGT partecipa al mantenimento delle difese intracellulari attraverso la mediazione del trasporto extracellulare di glutathione (156). Un'aumentata attività di GGT in risposta allo stress ossidativo servirebbe a facilitare il trasporto di glutathione nelle cellule.

Nel British Regional Heart Study, è stata osservata una forte e progressiva associazione indipendente fra livelli di GGT e incidenza di diabete nel periodo di follow-up, durato quasi 13 anni. Tale associazione si osservava nel normale range di valori della GGT e risultava indipendente da BMI e consumo di alcool. Nel Mexico City Diabetes Study (157), livelli più elevati di GGT (IV vs I quartile) risultavano predittori sia di IGT che di diabete (OR: 1.62; IC:1.08-2.42), dopo correzione per età, sesso, distribuzione del grasso corporeo, consumo di alcool, insulinemia e proinsulinemia a digiuno, glicemia a 2 ore dal carico orale di glucosio. Negli studi prospettici è solitamente stato valutato il valore predittivo dei livelli basali di GGT nei confronti del futuro sviluppo di diabete, recentemente è stato evidenziato che anche un incremento nel tempo dei livelli di tale enzima, pur sempre nel range di normalità, è correlato con un aumentato rischio di incidenza di diabete, indipendentemente dai valori basali di GGT (158). Pertanto elevati livelli di GGT potrebbero rappresentare un utile marker per l'identificazione dei soggetti a rischio di diabete.

8. Prevenzione del diabete tipo 2

La prevenzione del diabete, con strategie di popolazione e individuali, volte all'assunzione di stili di vita adeguati, è l'unica strada percorribile per ridurre l'elevato costo individuale e sociale della malattia (159). Nonostante la discussione sull'utilità clinica dell'OGTT nella valutazione del rischio cardiovascolare sulla predizione del diabete sia ancora aperta (160), gli studi di prevenzione del diabete di tipo 2 recentemente svolti hanno considerato soggetti con IGT o IFG suggerendo che su queste categorie di soggetti si dovrebbero focalizzare le strategie di prevenzione del diabete (162).

Al fine di prevenire e/o ritardare l'insorgenza del diabete, sono stati proposti e realizzati numerosi progetti di intervento; le strategie utilizzate si sono differenziate a seconda che il progetto fosse indirizzato all'intera popolazione o ad un gruppo di soggetti più ristretto e a rischio più elevato. In particolare si possono distinguere tre tipi di strategie:

- Strategie a monte (Up-stream). Programmi diretti alla popolazione generale che comprendono interventi di politica sanitaria e sociale per la promozione di stili di vita più salutari.
- Strategie intermedie (Mid-stream). Interventi diretti a popolazioni definite o comunità ad alto rischio, che si propongono di modificare lo stile di vita cercando così di influenzare il rischio di diabete.
- Strategie a valle (Down-stream). Programmi di intervento diretti ai soggetti ad alto rischio che mediante modificazione dello stile di vita (consigli su dieta ed esercizio fisico) o uso di farmaci si propongono di ridurre la conversione a diabete.

Al momento, non ci sono evidenze relative all'efficacia di un intervento su ampia scala come quelli di tipo up-stream. Una revisione della letteratura comparsa tra il 1990 e il 2001 (163) ha permesso di identificare 16 studi di intervento mid-stream, di cui 8 condotti negli USA su popolazioni ad alto rischio (Indiani-Americani, Messicani-Americani). Molti di questi lavori presentavano, però, delle limitazioni nel disegno, non prevedevano un gruppo di controllo o di paragone e risultano pertanto solo relativamente indicativi. Al contrario, i programmi di intervento down-stream sono gli unici ad aver fin'ora documentato i maggiori benefici. Infatti, numerosi ed ampi studi clinici a lungo termine, randomizzati e controllati, hanno fornito

evidenze che un efficace intervento sullo stile di vita, basato su abitudini alimentari corrette e l'aumento dell'attività fisica, possa migliorare la sensibilità insulinica, ridurre la glicemia a digiuno e post-prandiale, diminuire i livelli di acidi grassi liberi, migliorare il profilo lipidico e ritardare e prevenire la progressione da IGT a diabete.

Studi di intervento sullo stile di vita

- a. Da Qing IGT and diabetes study. Uno dei primi studi a fornire indicazioni sulla possibilità di prevenire il diabete mediante un intervento sullo stile di vita è stato lo studio cinese Da Qing (164), effettuato su 577 soggetti con IGT, randomizzati in quattro gruppi: nessun trattamento, solo esercizio, solo dieta, dieta ed esercizio, e seguiti per sei anni. La riduzione percentuale del rischio di progressione a diabete è stata del 31% ($p<0,03$) nel gruppo trattato con dieta, del 46% nel gruppo trattato con esercizio fisico ($p<0,0005$) e del 42% nel gruppo trattato con dieta ed esercizio fisico ($p<0,005$), dopo correzione per glicemia basale e BMI (Fig. 9).

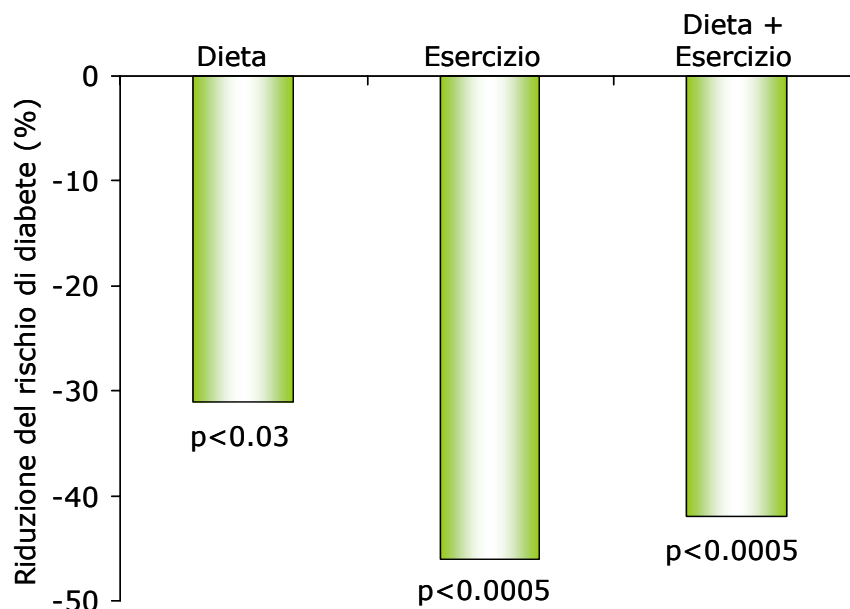


Figura 9. Riduzione del rischio di diabete ottenuta mediante variazione della dieta e/o incremento dell'attività fisica nello studio Da Qing.

b. *Finish Diabetes Prevention Study*. Lo studio finlandese DPS (*Diabetes Prevention Study*) (165), condotto su 522 soggetti in sovrappeso ($\text{BMI} \geq 25 \text{ Kg/m}^2$) e con IGT, randomizzati in due diversi tipi di intervento sullo stile di vita. Al gruppo di controllo sono state date istruzioni generali, orali e scritte, sulla dieta e l'esercizio fisico, mentre al gruppo di intervento è stato dato un consiglio individualizzato volto alla riduzione del peso corporeo (obiettivo riduzione almeno del 5%), all'alimentazione corretta con riduzione dell'apporto globale di grassi ed aumento dell'introito di fibre (almeno 15 g/1000 calorie), allo svolgimento di un adeguato esercizio fisico (moderato per almeno 30' al giorno). Questi soggetti hanno, inoltre, avuto 7 incontri con un nutrizionista nel primo anno e 4 incontri all'anno successivamente, con una guida personalizzata all'incremento dell'esercizio fisico mediante sessioni di allenamento ad hoc. L'incidenza cumulativa di diabete dopo 4 anni è stata dell'11% nel gruppo di intervento e del 23% nel gruppo di controllo (Fig. 10), con una riduzione del 58% (IC: 0.3-0.7; $p < 0.01$), specificamente del 63% negli uomini e del 54% nelle donne.

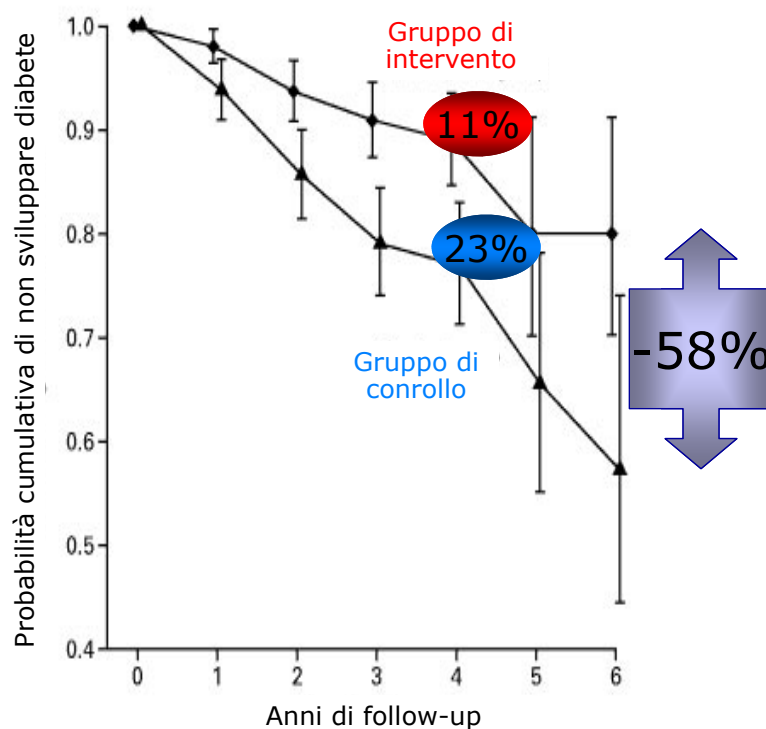


Figura 10. Prevenzione del diabete mellito tipo 2 in soggetti con IGT mediante intervento sullo stile di vita. Risultati del Diabetes Prevention Study.

Il tasso di conversione a diabete è stato del 3% nei soggetti trattati e del 6% nei soggetti di controllo. Nessun caso di diabete si è verificato in soggetti che avevano raggiunto 4 o 5 degli obiettivi dietetico-compartimentali preposti. Inoltre, l'insorgenza del diabete nel gruppo di controllo si è ridotta del 70% nei soggetti che hanno ottenuto un decremento ponderale almeno del 5% rispetto a quelli che hanno perso meno peso. Fra i soggetti che non hanno ottenuto decremento ponderale, l'insorgenza di diabete si è comunque ridotta dell'80% qualora fosse stato raggiunto l'obiettivo dell'esercizio fisico, rispetto ai soggetti più sedentari. Nel gruppo di intervento dopo un anno si sono osservati un decremento ponderale medio di $4,2 \pm 5,1$ kg e un miglioramento significativo di alcuni fattori di rischio cardiovascolare: colesterolo HDL, trigliceridi, pressione arteriosa sistolica e diastolica. Seguendo tale studio, per prevenire un caso di diabete occorre trattare 22 soggetti per un anno o 5 soggetti per 5 anni. Durante il follow-up, l'incidenza del diabete è stata del 4.4% e 7.4%, rispettivamente, nel gruppo di intervento e nel gruppo di controllo, indicando una riduzione del rischio relativo del 43%. Questa riduzione è legata al successo degli interventi attuati: riduzione del peso corporeo, modificazioni della dieta con riduzione dell'apporto di grassi e aumento dell'assunzione di fibre, e adeguato esercizio fisico. I benefici dati dalle modifiche dello stile di vita si sono mantenuti dal gruppo intervento anche dopo la fine del periodo di follow-up, con una riduzione del rischio relativo del 36%.

- c. Diabetes Prevention Program. Lo studio DPP (Diabetes Prevention Program) (166) ha arruolato 3234 soggetti (età media 51 anni; BMI medio $34,0 \text{ kg/m}^2$) con IGT o IFG e BMI $> 24 \text{ kg/m}^2$, randomizzandoli in tre gruppi: placebo, metformina (850 mg/die + informazioni standard su dieta e stile di vita), o un programma di modifica dello stile di vita che si proponeva una perdita di peso del 7% e almeno 150 minuti di attività fisica alla settimana. Il follow-up medio è stato 2,8 anni. Il 50% dei partecipanti ha raggiunto l'obiettivo del peso in 24 settimane e il 74% l'obiettivo dell'esercizio fisico. L'incidenza cumulativa del diabete è stata del 28,9% nel gruppo di controllo e del 14,4% nel gruppo trattato con intervento sullo stile di vita, con una riduzione significativa del 58% (I.C. 48-66%) (Fig. 11).

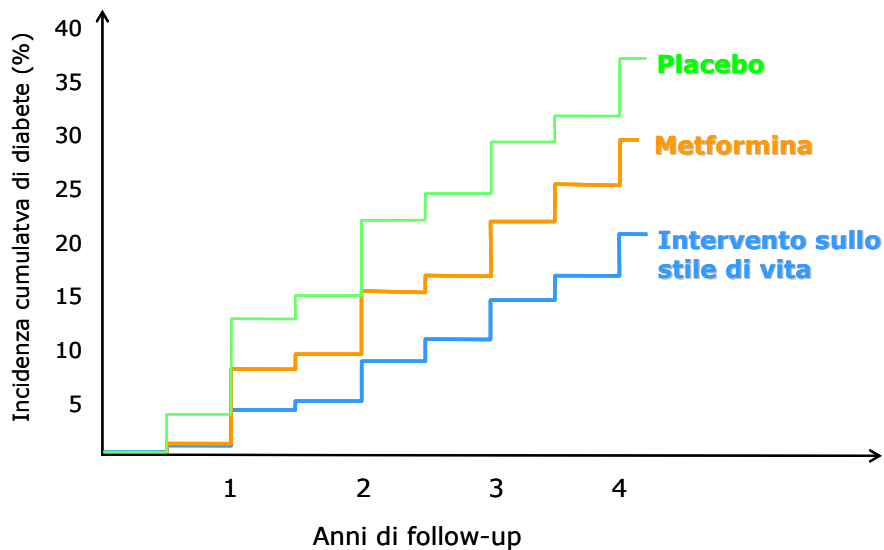


Figura 11. Incidenza di diabete nello studio Diabetes Prevention Program.

In tale studio il numero di soggetti da trattare per tre anni con terapia comportamentale per prevenire un caso di diabete è risultato pari a 6,9. La perdita di peso è stata il fattore predominante della ridotta incidenza del diabete (167). L'intervento sullo stile di vita è stato più efficace del placebo e della metformina sui fattori di rischio cardiovascolare (168).

- d. Studio Giapponese. Lo Studio Giapponese (169) è stato condotto su 458 uomini con IGT randomizzati in 2 gruppi: gruppo controllo (n. 356) e gruppo intervento (n. 102). Al gruppo di controllo e al gruppo di intervento è stato raccomandato di raggiungere e mantenere attraverso la dieta e l'esercizio fisico, rispettivamente, BMI ≤ 24 kg/m² e ≤ 22 kg/m². Ogni 3-4 mesi entrambe i gruppi sono stati sottoposti a visite ospedaliere durante le quali sono state ripetute loro le istruzioni sullo stile di vita al fine di mantenere i valori di BMI prefissati; mentre ogni 6 mesi ambo i gruppi eseguivano esami ematochimici ed OGTT per individuare miglioramento della tolleranza glucidica. Alla fine dei 4 anni di follow-up nel gruppo di controllo si è osservato un decremento ponderale medio di 0,39 kg mentre la diminuzione del peso corporeo nel gruppo di intervento è stata significativamente maggiore (2,18 kg; $p < 0,001$). L'incidenza cumulativa di diabete dopo 4 anni è stata del 3% nel gruppo di intervento e del 9,3% nel gruppo di controllo e il

rischio di diabete nel gruppo di intervento è stato ridotto del 67,4%. Il gruppo di controllo è stato inoltre subclassificato in 3 sottogruppi in base alle variazioni del peso corporeo: gruppo A: incremento di peso corporeo di 1 kg o più; gruppo B: peso corporeo non modificato; gruppo C: decremento del peso corporeo di 1 kg o più. I 3 gruppi non differiscono nei valori di BMI basale. L'incidenza cumulativa di diabete è stata del 14,7% nel gruppo A, del 10,6% nel gruppo B e del 4,3% nel gruppo C. L'incidenza di diabete è stata significativamente maggiore nel gruppo A che nel gruppo C, ma le differenze tra il gruppo A ed il gruppo B e tra il gruppo B ed il gruppo C non sono stati significativi. La percentuale di miglioramento della tolleranza al glucosio (IGT) dopo 4 anni è stata del 53,8% nel gruppo di intervento e del 33,9% nel gruppo di controllo ($P < 0.001$). Nei sottogruppi del gruppo di controllo e nel gruppo di intervento, si è osservata una correlazione positiva tra le modificazioni del peso corporeo e l'incidenza di diabete, e una correlazione negativa tra le variazioni del peso corporeo e il miglioramento della tolleranza glucidica. L'incidenza di diabete è stata significativamente superiore in coloro con valori più elevati di FPG basale (11,8%) rispetto a quelli con valori più bassi (5,4%; $p=0,044$). Soggetti con basso indice insulinogenico (DIRI/DPG 30 min dopo OGTT) hanno sviluppato diabete a un tasso significativamente più alto rispetto a quelli con un normale indice insulinogenico sia negli uomini sani ($p=0,0012$) che nel gruppo di controllo ($p=0,0021$). In accordo con gli altri studi di intervento sullo stile di vita anche lo studio giapponese ha dimostrato che le variazioni ponderali, non solo modificano l'incidenza di diabete ma migliorano, anche, la tolleranza glucidica. La perdita di peso è stata chiaramente associata con la normalizzazione della tolleranza al glucosio nei soggetti con IGT.

Studi di intervento farmacologico

Evidenze sul possibile uso di farmaci nella prevenzione del diabete di tipo 2 derivano da studi clinici che hanno cercato di contrastare le principali alterazioni metaboliche correlate allo sviluppo del DM.

- a. Diabetes Prevention Program. Nel gruppo trattato con metformina l'incidenza cumulativa di diabete è stata del 21,7% e l'incidenza

annuale di diabete del 78% con una riduzione significativa del 31% (IC: 17-43%) rispetto ai soggetti del gruppo di controllo (166). In tale studio il numero dei soggetti da trattare per tre anni con metformina per prevenire un caso di diabete risulta pari a 13,9. La prosecuzione dello studio dopo wash-out dal farmaco ha dimostrato che il 26% dell'effetto era dovuto alla sua azione farmacologica; dopo 2 settimane di wash-out dalla metformina la riduzione dell'incidenza del diabete era ancora del 25% (170). I vantaggi della metformina si sono verificati soprattutto nei soggetti più giovani e con il maggior grado di sovrappeso (BMI > 35%). Globalmente nel gruppo trattato con intervento sullo stile di vita si è osservata una riduzione dell'incidenza di diabete rispetto al gruppo con metformina del 39% (I.C. 24-51%).

- b. STOP-NIDDM. Studio multicentrico (171), della durata di 3 anni, condotto su 714 soggetti con IGT, randomizzati a trattamento con acarbose (inibitore dell' α -glicosidasi intestinale, che riduce l'iperglicemia post-prandiale) o placebo. Il 42% dei controlli ed il 32% dei soggetti trattati con acarbose hanno sviluppato diabete, con una riduzione del 25% (IC: 0.63-0.90) (Fig. 12); non si sono evidenziate differenze in relazione a sesso, età o indice di massa corporea.

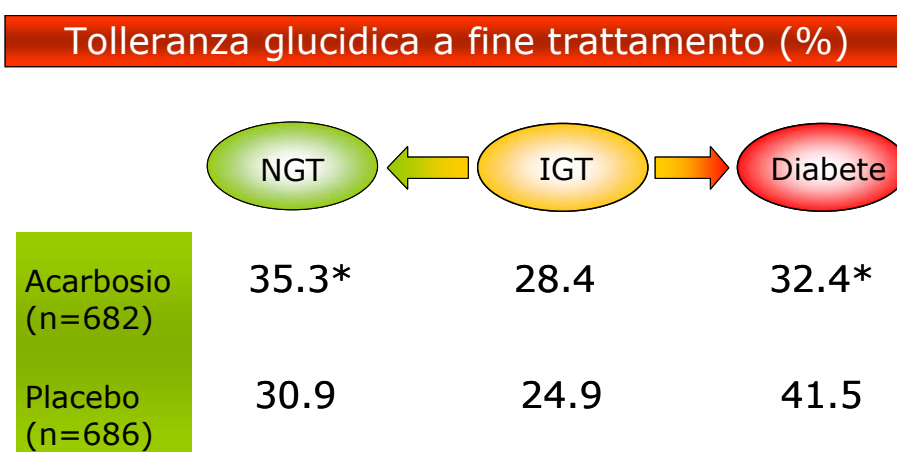


Figura 12. Effetti del trattamento con acarbosio sulla tolleranza glucidica in soggetti con IGT. *p<0.001.

Circa un quarto dei soggetti ha abbandonato lo studio per effetti collaterali, prevalentemente gastrointestinali. In tale studio il numero di pazienti da trattare per 3.3 anni per prevenire un caso di diabete è pari a 11.

- c. Troglitazone in the Prevention of Diabetes Mellitus. Nello studio TRIPOD (172) sono state randomizzate 266 donne ispaniche con pregresso diabete gestazionale e trattate con troglitazone 400 mg/die o placebo per un *follow-up* medio di 30 mesi. L'incidenza cumulativa di diabete è stata del 12.1% nel gruppo di controllo e del 5.4% nel gruppo trattato con troglitazone, con una riduzione del 55% (IC: 0.25-0.83). L'effetto si è mantenuto anche dopo 8 mesi dalla sospensione del farmaco ed è risultato correlato alla conservazione della funzione β -cellulare attraverso la riduzione dell'insulino-resistenza cronica. Il troglitazone è stato ritirato dal commercio per la sua tossicità epatica. Successivamente, lo studio osservazionale *Pioglitazone in Prevention of Diabetes* (PIPOD), proseguito sulle donne che avevano completato lo studio TRIPOD, ha dimostrato un'azione positiva del pioglitazone nel mantenimento della funzionalità pancreatica (173).
- d. XENical in the prevention of Diabetes in Obese Subjects. Lo studio XENDOS (174), prospettico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo ha valutato l'efficacia dell'orlistat, un inibitore della lipasi gastrica e pancreatica che limita del 30% l'assorbimento dei lipidi della dieta, combinato con dieta ed esercizio fisico nella prevenzione del diabete in 3304 pazienti con BMI >30 kg/m², di cui il 21% con IGT. L'incidenza cumulativa di diabete è stata rilevante solo nei soggetti con IGT e si è ridotta nel gruppo in trattamento con orlistat dal 28.8% al 18.8%, con una riduzione relativa del rischio di conversione a diabete del 45% circa. Il numero di pazienti obesi ipotolleranti da trattare per evitare un caso di diabete è risultato pari a 11.
- e. Diabetes Reduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication. Nello studio DREAM (175-176) sono stati arruolati 5269 soggetti (età media 54 anni) con IFG, IGT o entrambe le condizioni, privi di patologia cardiovascolare. I pazienti eleggibili sono stati assegnati in maniera randomizzata a un trattamento con 4 mg di rosiglitazone una volta al giorno per i primi quattro mesi, e quindi con

8 mg in monosomministrazione fino al termine dello studio. I soggetti sono stati contemporaneamente assegnati a un trattamento con ramipril 15 mg o placebo, nell'ambito di un disegno fattoriale 2x2. Il principale *end-point* era l'incidenza di diabete o la mortalità per tutte le cause nel corso del periodo di trattamento. La mediana di osservazione è stata di 3 anni. Il razionale dello studio è costituito sia dai risultati già ottenuti in altri studi di prevenzione del diabete con farmaci insulino-sensibilizzanti ed in particolare con glitazonici (studio TRIPOD), che dalle analisi osservazionali post-hoc di studi in cui l'uso di ACE-inibitori, si era associato ad una ridotta incidenza di diabete, in particolare lo studio Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) (177) in cui era stata osservata una riduzione del 34% del rischio di progressione verso il diabete nei soggetti in trattamento con ramipril. Il trattamento con ramipril (175) non ha ridotto in maniera significativa l'incidenza di diabete o la mortalità per qualunque causa (HR: 0.91; IC: 0.81-1.03; $p=0.15$), ma ha determinato più frequentemente la regressione verso la normoglicemia (HR: 1.16; IC: 1.7-1.27; $p=0.001$). Alla fine dello studio la mediana della glicemia a digiuno non era diversa nei due gruppi, mentre la glicemia due ore dopo il carico era significativamente più bassa nel gruppo trattato con ramipril (135.1 mg/dl vs 140.5 mg/dl; $p=0.01$). Non si sono osservate differenze nel numero degli eventi cardiovascolari. Lo studio, quindi, non ha dimostrato l'utilità del ramipril nella prevenzione del diabete, pur rilevandone una modesta azione favorevole sul metabolismo glucidico. L'uso di rosiglitazone (176), invece, si è associato ad una riduzione dell'incidenza di diabete del 60% (Fig. 13), analogamente a quanto ottenuto in altri studi con le misure dietetico-compartimentali e superiore a quella ottenuta con altri farmaci. Il numero di pazienti da trattare risultato per tre anni è risultato pari a 7; in altri termini per ogni 1000 pazienti trattati con rosiglitazone si ottiene la prevenzione di 144 nuovi casi di diabete mellito. Non si sono, invece, registrate differenze significative sull'incidenza di eventi cardiovascolari (end point secondario dello studio), per altro comunque poco numerosi data la brevità dell'osservazione e la tipologia dei pazienti (basso rischio cardiovascolare). Si è osservato, invece, un aumento dei casi di scompenso cardiaco

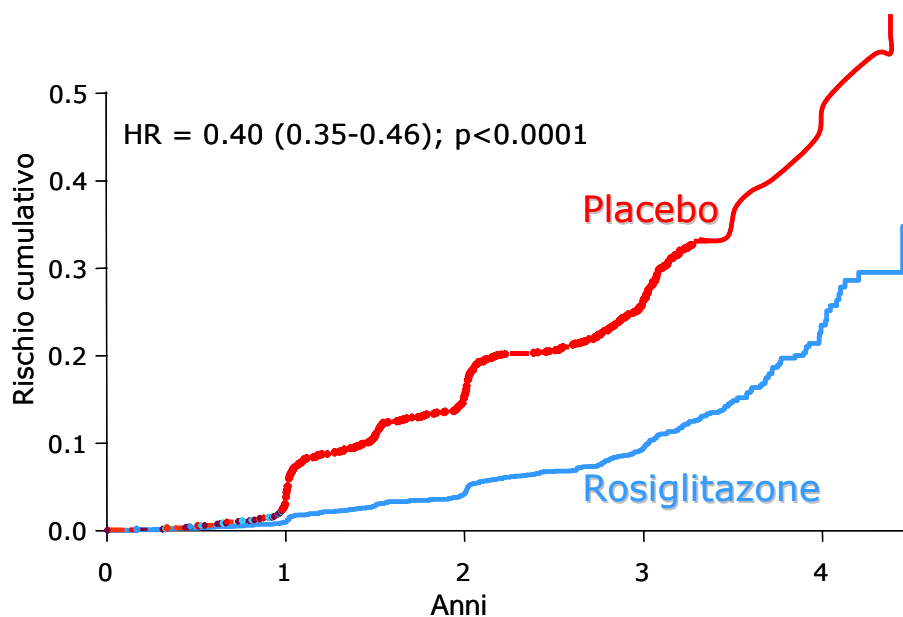


Figura 13. Prevenzione del diabete mediante l'uso di rosiglitazone nel DREAM Study.

- f. Altri studi che hanno valutato la prevenzione del diabete. Alcuni studi clinici con farmaci antipertensivi, ipolipemizzanti o il trattamento sostitutivo estro-progestinico, non ideati propriamente per valutare la possibilità di prevenire il diabete, hanno comunque mostrato la tendenza di alcuni trattamenti farmacologici a ridurre l'incidenza del diabete, agendo su meccanismi non del tutto noti, ma verosimilmente coinvolti nel più ampio quadro dell'insulino-resistenza. Ad esempio, il già citato studio HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*) (177) condotto su 9297 soggetti ad elevato rischio cardiovascolare, randomizzati a placebo o ramipril, per valutare primariamente l'incidenza di ictus, IMA e morte cardiovascolare, ha mostrato nel sottogruppo di soggetti non diabetici all'ingresso dello studio (5270) una riduzione di nuovi casi di diabete pari al 34% nel gruppo in trattamento attivo rispetto al placebo. Lo studio LIFE (*Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study*) (178-179), ideato per confrontare l'efficacia di losartan e atenololo nel ridurre la morbidità e la mortalità cardiovascolare, ha mostrato, nei soggetti non diabetici alla randomizzazione, una riduzione dell'incidenza del diabete del 25% nel gruppo in trattamento con losartan. Nel braccio di trattamento con pravastatina dello studio WOSCOPS (*West of Scotland Coronary Prevention Study*) (180) si è registrata una riduzione di nuovi

casi di diabete pari al 30%. Infine, nello studio HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*) (181-183) il trattamento ormonale sostitutivo riduceva del 35% l'insorgenza di diabete nelle donne in post-menopausa. Per stabilire quanto questi trattamenti farmacologici possano realmente incidere nell'intervento di prevenzione del diabete sono necessarie ulteriori verifiche e evidenze.

I dati finora esaminati (Tab. 4) confermano la possibilità di incidere in modo significativo sull'evoluzione del diabete tipo 2 e sui fattori di rischio ad esso associati, nei soggetti ad alto rischio, come ad esempio gli individui con alterata regolazione glucidica; allo stesso tempo, suggeriscono che con buona probabilità l'intervento preventivo sarà tanto più efficace se ai programmi di modifica dello stile di vita saranno associati trattamenti farmacologici efficaci e sicuri.

Tabella 4. Sommario dei principali studi di intervento per la prevenzione del diabete.

Studio	Incidenza cumulativa di diabete vs placebo (%)	Intervento	NNT (Numero necessario trattare)	Durata (anni)
Da Quing	66 vs 44	Stile di vita	4.5	6
DPS	42 vs 32	Stile di vita	8	4
DPP	29 vs 14	Stile di vita	7	3
DPP	29 vs 22	Metformina	14	3
TRIPOD	30 vs 14	Troglitazone	6	2,5
STOP-NIDDM	42 vs 32	Acarbosio	11	4
XENDOS	9 vs 6	Orlistat	36	3
DREAM		Rosiglitazone	7	3

Una migliore identificazione degli individui ad alto rischio e di coloro che tra questi sono maggiormente suscettibili a sviluppare la malattia, potrebbe aiutare a convogliare energie e risorse per una più efficace prevenzione. Al fine di migliorare la possibilità di successo dell'intervento preventivo sarà, inoltre, necessario tracciare strategie che risultino appropriate dal punto di vista culturale e socio-economico per la maggior parte, se non per la totalità della popolazione. Queste strategie devono essere particolarmente aggressive nei confronti dei gruppi ad alto rischio di sviluppare diabete, ma

devono anche essere dirette all'intera comunità in tema di educazione sanitaria. E' necessario far crescere la consapevolezza dell'importanza di seguire un corretto stile di vita e diffondere la conoscenza dei rischi connessi a patologie degenerative come il diabete e l'obesità. Interventi finalizzati alla modifica dello stile di vita devono avvenire precocemente, a partire dall'età scolare, dato che è in questa fascia d'età che si possono ottenere le maggiori possibilità di successo, in quanto sempre più difficile e meno fruttuoso risulta un intervento tardivo, effettuato in età adulta. Vi è, pertanto, un urgente bisogno che la scuola introduca programmi strutturati e formali su nutrizione e attività fisica come strumenti di benessere. Non trascurabile, infine, è l'opportunità di utilizzare i media per mettere in atto una campagna esplicita a favore di una corretta alimentazione e di una regolare attività fisica e diffondere messaggi diretti sulle tragiche conseguenze del diabete e dell'obesità a tutta la popolazione.

Bibliografia

1. Barnett KN, McMurdo ME, Ogston SA, Morris AD, Evans JM. Mortality in people diagnosed with type 2 diabetes at an older age: a systematic review. *Age Ageing* 2006;35:463-8.
2. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1029-1057.
3. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
4. World Health Organization. Diabetes mellitus – Report of a WHO study group. WHO Technical Report Series, No. 727, Geneva, Switzerland, 1985.
5. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus – provisional report of a WHO consultation group. *Diabet Med* 1998; 15: 539-553.
6. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycemia: the current status on definition and intervention. *Diabetic Medicine* 2002; 19:708-723.
7. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J: Global and social implication of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27:1047-1053.
9. Wing RR, Goldstein MG, Acton KJ et al. Behavioural science research in diabetes: lifestyle change related to obesity, eating behaviour, and physical activity. *Diabetes Care* 2001; 24:117-123.
10. Bruno G, Merletti F, Barbero G, Melis D, Masi I, Ianni A, Novelli G, Pagano G, Cavallo-Perin P. Changes over time in the prevalence and quality of care of type 2 diabetes in Italy: the Casale Monferrato Surveys, 1988 and 2000. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:39-45.
11. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Meigs JB, Bonadonna RC, Muggeo M; Bruneck study. Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. *Diabetes* 2004;53:1782-9.
12. Consequences of the new diagnostic criteria for diabetes in older men and women. DECODE Study (Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe). *Diabetes*

Care 1999;22:1667-71.

13. Handy SL, Boarnet MG, Ewing R, Killingsworth RE. How the built environment affects physical activity: Views from urban planning. *Am J Prev Med* 2002; 23:64-73.
14. Saelens BE, Sallis JF, Frank LD. Environmental correlates of walking and cycling: findings from the transportation, urban design, and planning literatures. *Ann Behav Med* 2003;25:80– 91.
15. Gorely T, Marshall SJ, Biddle SJH. Couch kids: Correlates of television viewing among youth. *Int J Behav Med* 2004; 11:152-63.
16. French SA, Story M, Jeffrey RW. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22:309–35.
17. Schluter G, Lee C. Changing food consumption patterns: their effects on the US food system, 1972–92. *Food Rev* 1999;22:35–7.
18. French SA. Pricing effects on food choices. *J Nutr* 2003; 133:841S–3S.
19. Drewnoski A. Fat and sugar: an economic analysis. *J Nutr* 2003; 133: 838S–40S.
20. French SA, Lin, BH, Guthrie, JF. National trend in soft drink consumption among children and adolescents age 6 to 17 years: Prevalence, amounts, and sources, 1977/1978 to 1994/1998. *J Am Diet Assoc* 2003; 103:1326-31.
21. Bowman SA, Gortmaker SL, Ebbeling CB, et al. Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. *Pediatrics* 2004;113:112-8.
22. French SA, Story M, Neumark-Sztainer D, et al. Fast food restaurant use among adolescents: Associations with nutrient intake, food choices and behavioral and psychosocial variables. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1823-33.
23. Jahns L, Siega-Riz AM, Popkin BM. The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. *J Pediatr* 2001;138:493–8.
24. Nielson SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Prev Med* 2002;35:107–13.
25. Lin BH, Guthrie JF, Frazao E. Nutrient contribution of food away from home. In: Frazao E, ed. *America's eating habits: changes and consequences*. Washington, DC: US Department of Agriculture, 1999:213–42.

26. Thompson OM, Ballew C, Resnicow K, Must A, Bandini LG, Cyr H, et al. Food purchased away from home as a predictor of change in BMI z-scores among girls. *Int J Obes* 2004;28:282– 9.
27. McCrory M, Fuss P, Hays N, Vinken A, Greenberg A, Roberts S. Overeating in America: association between restaurant food consumption and body fatness in healthy men and women ages 19 to 80. *Obes Res* 1999;7:564– 71.
28. Satia JA, Galanko J, Siega-Riz AM. Eating at fast-food restaurants is associated with dietary intake, demographic, psychosocial and behavioural factors among African Americans in North Carolina. *Pub Health Nutr* 2004;7:1089– 96.
29. Haines PS, Hungerford DW, Popkin BM, Guilkey DK. Eating patterns and energy and nutrient intakes of US women. *J Am Diet Assoc* 1992;92:698– 704.
30. French S, Harnack L, Jeffery R. Fast food restaurant use among women in the Pound of Prevention Study: dietary, behavioral and demographic correlates. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:1353–9.
31. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 2005;365:36-42. Erratum in: *Lancet* 2005;365:1030.
32. Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance – A population-based twin study. *Diabetologia* 1999; 42: 139-145.
33. Kobberling J, Tillil H. The genetic of diabetes mellitus. London, New York, Accademy Press 1982, pp.201-209.
34. Barroso I, Luan J, Middelberg RP. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *Plos Biol* 2003; 1(1):E20.
35. Hribal ML, Federici M, Porzio O, et al. The Gly-Arg972 amino acid polymorphism in IRS-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2004–2013.
36. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The mechanisms by which both heterozygous PPARgamma deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 41245–41254.
37. Peiris AN, Struve MF, Mueller RA, et al. Glucose metabolism in obesity influence of body fat distribution *J Chn Endocnnol Metab* 1988;67 760-7.

38. Haffner SM, Stem MP, Mitchell BD, et al Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes* 1990;39:283-8.
39. Cassano PA, Rosner B, Vokonas PS, et al Obesity and body fat distribution in relation to the incidence of non-insulindependent diabetes mellitus: a prospective cohort study of men in the Normative Aging Study. *Am J Epidemiol* 1992; 136:1474-86.
40. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, et al Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994;17:961-9.
41. Kaye SA, Folsom AR, Sprafka JM, et al. Increased incidence of diabetes mellitus in relation to abdominal adiposity in older women. *J Clin Epidemiol* 1991;44:329-34.
42. Lundgren H, Bengtsson C, Blohme G, et al Adiposity and adipose tissue distribution in relation to incidence of diabetes in women: results from a prospective population study in Gothenburg, Sweden *Int J Obes* 1989;13:413-23.
43. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, et al. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol* 1990; 132:501-13.
44. Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 1995;122:481-6.
45. Pijl H, Romijn JA, Benthem L, Meinders AE. Neuroendocrine sequelae of visceral fat accumulation: implications for cardiovascular disease and diabetes. *Neth J Med* 2000;56(3):76-79.
46. Rankinen T, Kim SY, Perusse L, Despres JP, Bouchard C. The prediction of abdominal visceral fat level from body composition and anthropometry: ROC analysis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:801-809.
47. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1997;145(7):614-619.
48. Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr* 2005;81(3):555-63.
49. Hu FB, Li TY, Colditz GA, Willett WC, Manson JE. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* 2003;289:1785-91.

50. Hu FB, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rimm EB. Physical activity and television watching in relation to risk for type 2 diabetes mellitus in men. *Arch Intern Med* 2001;161:1542-1548.
51. Helmrigh SP, Ragland DR, Leung RW, Paffenbarger RS Jr. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1991;325:147-152.
52. Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet*. 1991;338:774-778.
53. Manson JE, Nathan DM, Krolewski AS, Stampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. *JAMA*. 1992;268:63-67.
54. Burchfiel CM, Sharp DS, Curb JD, et al. Physical activity and incidence of diabetes: the Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol*. 1995;141:360-368.
55. Perry IJ, Wannamethee SG, Walker MK, Thomson AG, Whincup PH, Shaper AG. Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men. *BMJ*. 1995;310:560-564.
56. Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Speizer FE, Manson JE. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA*. 1999;282(15):1433-9.
57. Jeon CY, Lokken RP, Hu FB, van Dam RM. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2007;30(3):744-752.
58. Goodyear LJ, Kahn BB: Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 1998; 49:235-261.
59. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, Roden M, Cline GW, Gerow K, Rothman DL, Shulman GI: Increased glucose transport phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulinresistant subjects. *NEngl J Med* 1996; 335:1357-1362.
60. WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *JAMA* 1997;277:472-7.
61. Salmeron J, Ascherio A, Rimm EB, et al. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 1997;20:545-50.
62. Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, et al. A prospective study of wholegrain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in US women. *Am J Public Health* 2000;90:1409-15.

63. Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* 2001;44:805-17.
64. van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB (2002) Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* 25:417-424.
65. Misra A, Ganda OP. Migration and its impact on adiposity and type 2 diabetes. *Nutrition*. 2007 Sep;23(9):696-708.
66. Bradley PJ. The thrifty genotype in non-insulin dependent diabetes. *BMJ*. 1993; 1;306:1198.
67. Hanna FWF, Peters JR. Screening for gestational diabetes; past, present and future. *Diabet Med* 2002; 19: 351-358.
68. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2002; 25:1862-8.
69. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome. A summary of the evidence. *Diabetes Care* 2005; 28:1769-1778.
70. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation 1999.
71. Executive summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
72. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-1062.
73. Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:499-507.
74. Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson PO, et al. Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertil Steril* 1992;57:505-13.
75. Legro RS, Kusanman AR, Dodson W, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:165-9.
76. Weerakiet S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S,

- Chuangsoongnoen N, Rojanasakul A. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynecol Obstet* 2001;75:177–84.
77. Turner NC, Clapham JC. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulindependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res.* 1998; 51: 33-94.
 78. Stern M. Natural history of macrovascular disease in type 2 diabetes. Role of insulin resistance. *Diabetes Care* 1999; 22 Suppl 3: C2-5.
 79. Meigs JB. Metabolic syndrome: in search of a clinical role. *Diabetes Care* 2004; 27: 2761-3.
 80. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-6.
 81. Yki-Jarvinen H. Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism: implications for the development of new therapies. *Diabet Med* 1997; 14 Suppl 3: S32-7.
 82. Gulli G, Ferrannini E, Stern M, Haffner S, DeFronzo RA: The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucosetolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes* 1992; 41:1575–1586.
 83. Davidson MB, Landsman PB, Alexander CM: Lowering the criterion for impaired fasting glucose will not provide clinical benefit. *Diabetes Care* 2003; 26:3329–3330.
 84. Schriger DL, Lorber B: Lowering the cut point for impaired fasting glucose: where is the evidence? Where is the logic? *Diabetes Care* 2004; 27:592– 601.
 85. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of β -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 2006; 29:1130–1139.
 86. Weyer C, Bogardus C, Pratley RE. Metabolic characteristics of individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1999; 48:2197–203.
 87. DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC: Fasting hyperglycemia in non-insulin- dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism* 1989; 38:387–395.
 88. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, Jenkinson C, Ritchardson D, DeFronzo RA. Insulin secretion and insulin action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study

(VEGAS). Diabetes 2006;55:1430-5.

89. Festa A, D'Agostino R Jr, Hanley AJ, Karter AJ, Saad MF, Haffner SM. Differences in insulin resistance in nondiabetic subjects with isolated impaired glucose tolerance or isolated impaired fasting glucose. Diabetes 2004; 53:1549–1555.
90. Rajala U, Laakso M, Qiao Q, Keinanen-Kiukaanniemi S. Prevalence of retinopathy in people with diabetes, impaired glucose tolerance and normal glucose tolerance. Diabetes Care 1998; 21: 1664-1669.
91. Engelgau MM, Narayan KM, Herman WH: Screening for type 2 diabetes. Diabetes Care 2000;23:1563-80.
92. Diabetes UK. Position Statement. Early identification of people with Type 2 diabetes. www.diabetes.org.uk.
93. Harris R, Donahue K, Rathore SS, Frame P, Woolf SH, Kathleen KN. Screening Adults for Type 2 Diabetes: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2003;138:215-229.
94. American Diabetes Association and National Institute of Diabetes Digestive and Kidney Diseases. The prevention or delay of type 2 diabetes. Diabetes Care 2002; 25: 742-749.
95. The DECODE study group on behalf of the EDESG. New diagnostic criteria for diabetes mellitus: will they change the phenotype of the diabetic subjects? BMJ 1998; 317: 371-375.
96. Griffin SJ, Little PS, Hales CN, Kinmonth AL, Wareham NJ. Diabetes risk score: towards earlier detection of Type 2 diabetes in general practice. Diabetes Metab Res Rev 2000; 16: 164-171.
97. Saaristo T, Peltonen M, Lindstrom J, Saarikoski L, Sundvall J, Eriksson JG. Cross-selection evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score: a tool to identify undetected type 2 diabetes, abnormal glucose tolerance and metabolic syndrome. Diab Vasc Dis Res 2005; 2: 67-72.
98. Schulze MB, Hoffman K, Boeing H, Linsein J, Rohrmann S, Möhling M, Pfeiffer AF, Spranger J, Tharmer C. An accurate risk score base on anthropometric, dietary and lifestyle factors to predicts the development of type 2 diabetes. Diabetes Care 2007; 30. 510-515.
99. Franciosi M, De Berardis G, Rossi MCE, Sacco M, Belfiglio M, Pellegrini F, Tognoni G. Use of the Diabetes Risk Score for opportunistic screening of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance. Diabetes Care 2005; 28:1187-94.
100. Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. Horm Metab Res. 2007 ;39(10):707-9.

101. Sjöholm A, Nyström T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:4-10.
102. Haffner SM. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;61 Suppl 1:S9-S18.
103. Haffner SM. Insulin Resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 2003; 92(suppl):18J-26J.
104. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA et al. (2003) Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *JBiol Chem* 278:13740-13746.
105. Fernandez-Real JM, Ricart W (2003) Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24:278-301.
106. Rask-Madsen C, Dominguez H, Ihlemann N, Hermann T, Kober L, Torp-Pedersen C. Tumor necrosis factor alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 2003; 108:1815-1821.
107. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracey RP, Heiss G, for the ARIC Investigators: Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353:1649-1652.
108. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102:42-47.
109. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:972-978.
110. Forouhi NG, Sattar N, McKeigue PM. Relation of C-reactive protein to body fat distribution and features of the metabolic syndrome in Europeans and South Asians. *Int J Obes* 2001; 25:1324-1328.
111. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286:327-334.
112. Sattar N, Scherbakova O, Ford I et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004; 53: 2855-60.

113. Laaksonen DE, Niskanen L, Nyyssonen K et al. C-reactive protein and the development of the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetologia* 2004; 47: 1403-10.
114. Doi Y, Kiyohara Y, Kubo M et al. Elevated C-reactive protein and the development of diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2497-500.
115. Meigs JB, Hu FB, Rifai N et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004; 291: 2529-35.
116. Festa A, D'Agostino R, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes mellitus: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes* 2002; 51:1131-1137.
117. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G, for the ARIC Investigators: Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353 :1649 –1652.
118. Festa A, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 :562 –568.
119. Juhan-Vague I, Thompson SG, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome: a study of 1500 patients with angina pectoris. *Arterioscler Thromb* 1993;13 :1865 –1873.
120. Potter van Loon BJ, Kluft C, Radder JK, Blankenstein MA, Meinders AE. The cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor type 1 is related to insulin resistance. *Metabolism* 1993; 42 :945 – 949.
121. Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PWF. Hyperinsulinemia, hyperglycemia and impaired hemostasis. The Framingham Study. *JAMA* 2000; 283:221-228.
122. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:264-80.
123. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930–1935.
124. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL et al. Circulating Concentrations of the Adipocyte Protein Adiponectin Are Decreased in Parallel With

Reduced Insulin Sensitivity During the Progression to Type 2 Diabetes in Rhesus Monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126–1133.

125. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J: Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360:57–58.
126. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2004;53:2473– 8.
127. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:85–9.
128. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Tominaga M, Kato T; Funagata study. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care* 2003;26:2015-20.
129. Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003; 26:3226–3229.
130. Snijder MB, Heine RJ, Seidell JC, Bouter LM, Stehouwer CD, Nijpels G, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Dekker JM. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. *Diabetes Care* 2006;29:2498-503.
131. Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Meisinger C, Lowel H. Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1369-77.
132. Manson JE, Skerrett PJ, Greenland P, VanItallie TB. The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. *Arch Intern Med* 2004;164:249–258.
133. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1136–1143.
134. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (Suppl.):S186–S190.
135. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844–1850.

136. Duckworth WC, Hamel FG, Peavy DE. Hepatic metabolism of insulin. *Am J Med* 1988; 85:71–76.
137. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000; 6:87–97.
138. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (Supl.):S186–S190.
139. Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Ann Intern Med* 1984; 101:847–851.
140. Shaper AG, Pocock SJ, Ashby D, Walker M, Whitehead TP. Biochemical and haematological response to alcohol intake. *Ann Clin Biochem* 1985; 22:50–61.
141. Goto T, Onuma T, Takebe K, Kral JG. The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19:841–845.
142. Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulinsensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19:846–850.
143. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1889–95.
144. Ohlson LO, Larsson B, Bjorntorp P, Eriksson H, Svardsudd K, Welin L, Tibblin G, Wilhelmsen L. Risk factors for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913. *Diabetologia* 1988; 31:798–805.
145. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, Steffes M: Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension:the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49:1358–1366.
146. Lee DH, Ha MH, Kim JH, Christiani DC, Gross MD, Steffes M, Blomhoff R, Jacobs DR Jr: Gamma-glutamyltransferase and diabetes-a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003; 46:359–364.
147. Nakanishi N, Nishina K, Li W, Sato M, Suzuki K, Tatara K: Serum gamma-glutamyltransferase and development of impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *J Intern Med* 2003; 254:287–295.
148. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E,

- Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J; west of Scotland coronary prevention study. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004;53:2855-60.
149. Kim DJ, Noh JH, Cho NH et al. Serum γ -glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005; 22:1134-1140.
 150. Yokoyama H, Hirose H, Moriya S, Saito I. Significant correlation between insulin resistance and serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in non-drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26:91S-94S.
 151. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum γ -Glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004; 27:1427-1432.
 152. Lee DH, Jacobs Jr DR, Gross M et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49:1358-1366.
 153. Andre P, Balkau B, Born C, Royer B, Wilpart E, Charles MA, Eschwege E. Hepatic markers and development of type 2 diabetes in middle aged men and women: a three-year follow-up study. The D.E.S.I.R. Study (Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome). *Diabetes Metab* 2005;31:542-50.
 154. Lim JS, Lee DH, Park JY, Jin SH, Jacobs DR Jr. A strong interaction between serum gamma-glutamyltransferase and obesity on the risk of prevalent type 2 diabetes: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Chem* 2007;53:1092-8.
 155. Lim JS, Yang JH, Chun BY et al. Is serum gamma-glutamyl transferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1018-1023.
 156. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001; 276:3798-3804.
 157. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, Stern MP, Ferrannini E; Mexico City diabetes study. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005;28:1757-62.
 158. Andre P, Balkau B, Born C, Charles MA, Eschwege E; D.E.S.I.R. study group. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase

level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. *Diabetologia* 2006;49:2599-603.

159. Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 2006; 368:1673-79.
160. Davidson MB: Counterpoint: the oral glucose tolerance test is superfluous. *Diabetes Care* 2002; 25:1883-1885.
161. Toumilehto J. Point: a glucose tolerance test is important for clinical practice. *Diabetes Care* 2002;25:1880-1882.
162. Satterfield DW, Murphy D, Essien JD et al. Community-based lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2643-2652.
163. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, Hu ZX, Lin J et al: Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997; 20:537-544.
164. Toumilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H et al: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344:1343-1350.
165. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346:393-403.
166. Hamman RF, Wing RR, Edelstein SL, Lachin JM, Bray GA, Delahanty L, Hoskin M, Kriska AM et al: Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29:2102-2107.
167. Ratner R, Goldberg R, Haffner S, Marcovina S, Orchard T, Fowler s, Tempresa M. Prevention Program Research Group. Impact of intensive lifestyle and metformin therapy on cardiovascular disease risk factors in the diabetes prevention program. *Diabetes Care* 2005; 28:888-894.
168. Kosaka K, Noda M, Kuzuya T. Prevention of type 2 diabetes by lifestyle intervention: a Japanese trial in IGT males. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005; 67:152-162.
169. Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of withdrawal from metformin on the development of diabetes in the diabetes prevention program. *Diabetes Care* 2003; 26:977-978.
170. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 2002; 359:2072-2077.

171. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A et al. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002; 51:2796-2803.
172. Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J et al: Effects of pioglitazone on pancreatic beta-cell function and diabetes risk in Hispanic women with prior gestational diabetes. *Diabetes* 2006; 55:517-522.
173. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjostrom L. XENical in prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004; 27:155-611.
174. Yusuf S, Gerstein H, Hoogwerf B et al. Ramipril and the development of diabetes. *JAMA* 2001; 286: 1882-1885.
175. DREAM Trial Investigators, Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, Diaz R et al: Effects of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 2006; 355:1551-1562.
176. DREAM (Diabetes Reduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators, Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J et al. Effects of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368:1096-1105.
177. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Hearth Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342:145-153.
178. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 995-1003.
179. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 1004-1010.
180. Freeman DJ, Norrie J, Satter N et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a prospective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103: 357-362.
181. Hulley S, Grady D, Bush T et al. Randomised trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Heart and Estrogen/Progestin*

Replacement Study (HERS) Research Group. JAMA 1998; 280: 605-613.

182. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 2003; 138: 1-9.
183. Wilson PW: Lower diabetes risk with hormone replacement therapy: an encore for estrogen? Ann Intern Med 2003;138:69-70.

Parte sperimentale

Introduzione

La prevenzione delle malattie, compreso il diabete mellito tipo 2, fonda le sue basi sull'identificazione di una serie di elementi (fattori di rischio) la cui presenza e intensità si associa con il rischio di sviluppare la malattia stessa. I fattori di rischio, ampiamente diffusi nella popolazione, agiscono in un continuum di rischio progressivamente crescente e sembrano potenziarsi a vicenda. Studi osservazionali hanno, infatti, dimostrato che il rischio globale di un individuo in cui coesistono più fattori di rischio è la conseguenza di una relazione esponenziale e non puramente additiva. Di conseguenza, risulta rilevante il vantaggio che si può ottenere dalla concomitante correzione di più fattori di rischio. Ampi studi epidemiologici e clinici hanno consentito di individuare i principali fattori di rischio per il diabete, in grado di promuovere i processi biochimici alla base della comparsa della malattia e di favorirne la progressione. Ai fattori di rischio *non-modificabili* quali età, sesso e fattori genetici, si affiancano i fattori di rischio *modificabili* principalmente correlati alle abitudini alimentari e allo stile di vita.

Negli ultimi anni, parallelamente all'interesse crescente per alcuni aspetti cellulari e molecolari potenzialmente associati all'insorgenza e alla progressione della malattia diabetica e cardiovascolare, si sono accumulate numerose informazioni su possibili "nuovi" marcatori biologici.

L'infiammazione cronica di basso grado e l'aumento di stress ossidativo potrebbero contribuire allo sviluppo di insulino-resistenza e di diabete tipo 2 e costituire parte di uno scenario comune tanto a patologie metaboliche quanto a patologie cardiovascolari. Infatti, sia l'infiammazione che lo stress ossidativo sono stati correlati alla presenza di tali condizioni patologiche e, studi condotti negli ultimi anni, ne hanno evidenziato le potenzialità nel predire lo sviluppo di malattie aterosclerotiche e di diabete tipo 2.

I livelli sierici di Gamma-Glutamil-Transferasi (GGT), ancora in fase di valutazione per verificare la loro effettiva utilità nella pratica clinica, sono stati proposti sia come biomarcatori dello stato infiammatorio (1) sia come nuovo indice per la valutazione dello stress ossidativo (2) e potrebbero rappresentare un utile marker per l'identificazione dei soggetti a rischio di diabete. La GGT, prodotta principalmente dalle cellule epiteliali dei dotti

intraepatici, è l'enzima responsabile del catabolismo extracellulare del glutathione (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina), il principale agente antiossidante intracellulare delle cellule umane (3). La GGT catalizza il primo passaggio nel catabolismo extracellulare del GSH ossia la rimozione della porzione γ -glutamilica del tripeptide. L'attività enzimatica si associa a processi pro-ossidanti che provocano la formazione di specie reattive dell'ossigeno come il superossido ed il perossido (4) (Fig. 14). La GGT, al contrario di altri enzimi epatici, non viene rilasciata nel plasma in seguito a citolisi, ma in associazione alle lipoproteine, di cui sembra essere un costituente normale. Le HDL in particolare, ma anche le LDL e le VLDL, sembrano trasportare la GGT; solo una piccola parte sembra essere libera o associata all'albumina. La quota di GGT veicolata dalle lipoproteine sale all'aumentare dei livelli sierici di GGT. Alcuni studi hanno dimostrato che la GGT è, inoltre, capace di catalizzare l'ossidazione di lipoproteine umane (Emdin), fattore primario nella genesi della placca aterosclerotica.

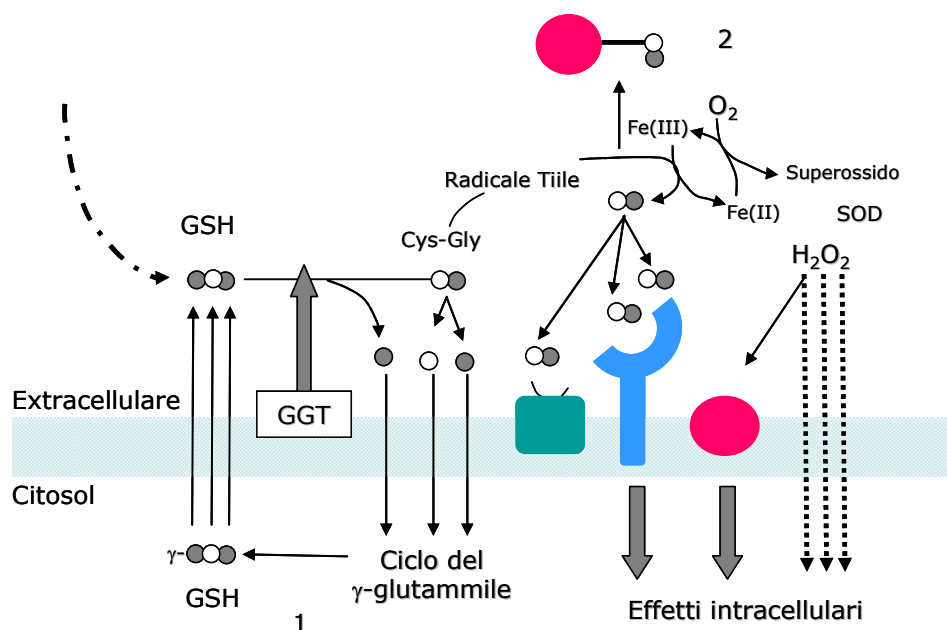


Figura 14. Catabolismo GGT-dipendente del glutathione (GSH) extracellulare: 1- recupero degli amminoacidi precursori per la sintesi del GSH intracellulare; 2- potenziali reazioni pro-ossidanti nell'ambiente extracellulare.

Il livello di attività della GGT viene utilizzato correntemente come indice di disfunzione epatobiliare e di abuso di alcool. L'attività sierica della GGT è influenzata da fattori genetici ed ambientali. Oltre alle patologie epatobiliari e all'abuso di alcool, altri fattori influenzano i suoi valori all'interno del

range di normalità. Ad esempio, gli studi di Wannamethee (5), Ruttmann (6) e Nilsen (7) mostrano un'associazione positiva tra GGT sierica e diabete mellito, ipertensione, valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica, BMI, colesterolo totale, frequenza cardiaca e glicemia, abitudine al fumo, impiego di contraccettivi orali e menopausa, tutti fattori positivamente associati con il rischio cardiovascolare. D'altra parte, la GGT mostra un'associazione negativa con l'attività fisica, la funzione polmonare (volume espiratorio forzato in un secondo) e il consumo di caffè. Dopo correzione statistica per queste variabili, la GGT mantiene un valore prognostico indipendente nei confronti della patologia cardiovascolare, confermando che non è solo la correlazione positiva con fattori di rischio per l'aterosclerosi a determinare l'associazione tra GGT e il rischio di infarto ed ictus (6). A spiegare questa correlazione può contribuire l'osservazione che l'aumento dell'attività della GGT per degradare il glutathione rispecchia un aumento dello stress ossidativo.

Le cellule sono continuamente esposte alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), in quanto il metabolismo ossidativo avviene normalmente durante le funzioni cellulari fisiologiche, conseguentemente alla produzione di energia mediante la riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua attraverso la respirazione aerobica. In condizioni fisiologiche, inoltre, i radicali liberi rivestono un ruolo regolatorio nella funzione cellulare, agendo come secondi messaggeri e modulando la funzione di differenti vie metaboliche. Tutto il processo avviene in presenza delle molecole antiossidanti che ne controbilanciano la produzione, mantenendo uno stato di equilibrio. Tuttavia, l'esposizione a specie ossidanti esogene (radiazioni, inquinamento, dieta) o l'instaurarsi di processi patologici (come i processi infiammatori) può provocare uno sbilanciamento di tale stato, e indurre una condizione di stress ossidativo. Questa situazione, caratterizzata da aumentata produzione di ROS e/o perdita nelle normali difese antiossidanti, può evolvere fino a determinare un marcato danno a livello cellulare. I ROS, infatti, possono reagire con tutte le molecole presenti all'interno della cellula, siano esse proteine, lipidi, carboidrati o acidi nucleici, e causare l'alterazione di numerose vie metaboliche fino ad arrivare ad impedire le normali funzioni cellulari e innescare processi infiammatori.

Poiché, uno stato infiammatorio cronico di basso grado e lo stress ossidativo partecipano a più livelli alla patogenesi del diabete mellito tipo 2,

la determinazione della GGT sierica potrebbe rappresentare un incoraggiante marcatore indipendente per l'identificazione dei soggetti a rischio diabete.

Razionale e obiettivi dello studio

Il livello di Gamma-Glutamil-Transferasi (GGT), comunemente utilizzato come indicatore di epatopatie o associato ad un eccessivo consumo di alcool, è stato recentemente proposto come marker di stress ossidativo (8) e numerosi studi di popolazione hanno correlato la presenza di elevati livelli di GGT con i fattori di rischio cardiovascolare (9), la sindrome metabolica (10), l'insulino-resistenza (11) e il diabete tipo 2 (DM2) (9-10, 12-13).

Tuttavia, a nostra conoscenza, nessuno studio ha esaminato il ruolo di GGT nelle differenti classi di regolazione glicemica, né ha valutato la sua relazione con la sensibilità e la secrezione insulinica in soggetti ad alto rischio di sviluppare diabete.

Per tale motivo, lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la presenza di un'eventuale associazione fra livello di GGT, alterata regolazione glicemica (IGR), insulino-resistenza e secrezione insulinica in soggetti ad elevato rischio di diabete.

Pazienti e Metodi

Soggetti esaminati

Sono stati inclusi nello studio 500 soggetti (199 uomini e 301 donne) afferiti consecutivamente all'ambulatorio per la Diagnosi e la Prevenzione del Diabete dell'U.O. di Malattie Metaboliche e Diabetologia dell'Ospedale di Cisanello (Pisa) per l'esecuzione di una curva da carico orale di glucosio. Nell'analisi dei dati sono stati inseriti solo coloro che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione (n.489): livelli di transaminasi (AST e/o ALT) e GGT <100 U/L, negatività dei marcatori dell'epatite virale e assunzione di alcool <500 ml/die. Ad ogni soggetto è stato prelevato, dopo un digiuno di 10-12 ore, un campione di sangue per gli esami di laboratorio. Successivamente è stato eseguito un OGTT con 75 g di glucosio con misurazione di glicemia e C-peptide a 15, 30, 60, 90 e 120 minuti. Oltre ai dati demografici e clinici sono stati registrati le abitudini personali e misurati peso corporeo, altezza, circonferenza vita (misurata a livello dell'ombelico) e pressione arteriosa.

Parametri biochimici

Tutti i parametri biochimici sono stati determinati attraverso metodi standard con Roche-Modular Autoanalyzer (Milano, Italia). Insulina e peptide-C sono stati determinati con tecnica immunoradiometrica. La concentrazione di colesterolo LDL è stata calcolata con la formula di Friedewald.

L'indice HOMA-R è stato calcolato secondo la formula: $[\text{insulina a digiuno (mU/L)} \times \text{glicemia a digiuno (mmol/L)} / 22,5]$ come descritto da Matthews (14).

L'indice insulinogenico è stato calcolato come $\text{CP30-CP0}/18 \times (\text{G30-G0})$, dove CP0 è il peptide-C a digiuno, CP30 è il peptide-C dopo 30 minuti dal carico orale di glucosio, mentre G0 è la glicemia a digiuno e GD30 glicemia dopo 30 minuti dal carico di glucosio.

Sulla base dei risultati dell'OGTT, seguendo i criteri dell'American Diabetes Association del 1997 (15), i soggetti sono stati classificati in tre categorie: normale tolleranza glucidica (NGT), alterata glicemia a digiuno (IFG), alterata tolleranza glucidica (IGT).

La sindrome metabolica è stata definita secondo i criteri NCEP-ATP III (16).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. La variabile continua GGT è stata divisa in quartili, mentre le variabili nominali sono state dicotomizzate come presenti o assenti. La statistica descrittiva è stata utilizzata per valutare la prevalenza delle differenti classi di regolazione glucidica in relazione ai quartili di GGT. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per valutare le differenze fra gruppi. Valori di P inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente rilevanti. L'analisi della regressione logistica è stata impiegata per stimare l'associazione fra la variabile dipendente (classi di regolazione glicemica) e le variabili indipendenti (GGT e altri fattori di rischio) in tre modelli. Modello 1: analisi aggiustata per età e genere; Modello 2: Modello 1 + familiarità per diabete, fumo, consumo di alcool, attività fisica, BMI; Modello 3: Modello 2 + AST, ALT e HOMA-IR. Nell'analisi logistica è stato utilizzato il logaritmo di GGT. I risultati di questa analisi sono espressi come odds ratio (OR) con il 95% di intervallo di confidenza (CI).

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando il software StatView (SAS Institute; Cary, NC) su Power Mac G5 (Apple; Cupertino, CA).

Risultati

Le principali caratteristiche antropometriche e biochimiche dei 500 soggetti (199 uomini e 301 donne) arruolati nello studio sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche antropometriche e biochimiche della popolazione dello studio.

Parametro	Media \pm Deviazione standard
Età (anni)	47 \pm 11
Fumatori (%)	21
Praticanti attività fisica (%)	33
BMI (Kg/m ²)	28.5 \pm 5.5
Circonferenza vita (cm)	102 \pm 14
Pressione sistolica (mmHg)	128 \pm 16
Pressione diastolica (mmHg)	80 \pm 11
Glicemia a digiuno (mg/dl)	98 \pm 15
Colesterolo totale (mg/dl)	208 \pm 40
Colesterolo LDL (mg/dl)	131 \pm 39
Colesterolo HDL (mg/dl)	55 \pm 20
Trigliceridi	144 \pm 122
ALT (U/L)	26 \pm 14
AST (U/L)	21 \pm 7
GGT (U/L)	25 \pm 17

All'OGTT, il 4% mostrava IFG, il 19% IGT e il 8% IFG+IGT (Fig. 1). Si evidenziava, inoltre, un 13% di soggetti con diabete neodiagnosticato.

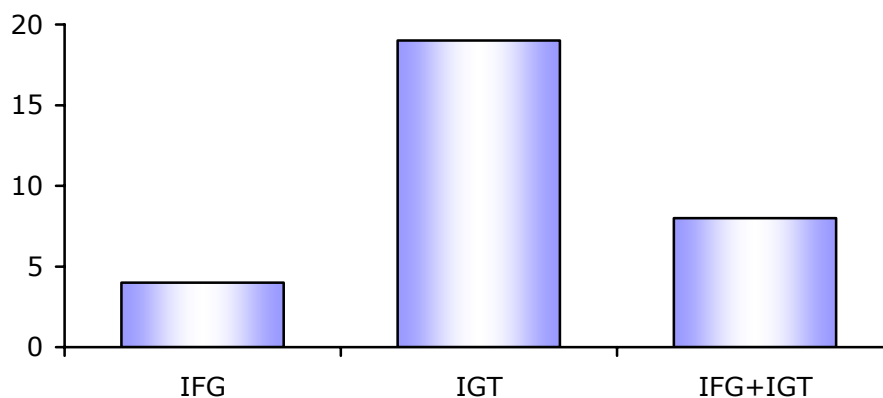


Figura 1. Prevalenza delle differenti categorie di pre-diabete sulla base dell'OGTT.

BMI, circonferenza vita, pressione sistolica e diastolica, glicemia a digiuno, colesterolo totale ed LDL, trigliceridi, AST, ALT così come la prevalenza di sindrome metabolica risultavano più elevati nel IV quartile di GGT rispetto al I quartile (ANOVA: $p < 0.0001$), mentre il livello di colesterolo HDL risultava più basso (ANOVA: $p < 0.005$) (Tab. 2).

Tabella 2. Principali parametri antropometrici e biochimici in relazione al livello di GGT, espresso in quartili. *Differenze fra I e IV quartile.

	γ -glutamyl transferasi				p^*
	I quartile (<14)	II quartile ($14-20$)	III quartile ($21-33$)	IV quartile (>33)	
BMI (Kg/m^2)	27.0 ± 6.2	27.8 ± 4.9	29.8 ± 5.0	29.9 ± 5.3	<0.0001
Circonferenza vita (cm)	97 ± 15	101 ± 14	104 ± 12	105 ± 11	<0.0001
Pressione sistolica (mmHg)	120 ± 14	130 ± 17	129 ± 15	133 ± 14	<0.0001
Pressione diastolica (mmHg)	76 ± 9	80 ± 13	81 ± 12	83 ± 11	<0.0001
Glicemia a digiuno (mg/dl)	90 ± 12	98 ± 14	99 ± 18	103 ± 14	<0.0001
Colesterolo totale (mg/dl)	196 ± 38	211 ± 41	209 ± 36	218 ± 41	<0.0001
Colesterolo LDL (mg/dl)	120 ± 37	135 ± 37	130 ± 38	140 ± 40	<0.0001
Colesterolo HDL (mg/dl)	59 ± 16	56 ± 15	54 ± 23	51 ± 23	<0.005
Trigliceridi	95 ± 51	130 ± 78	167 ± 183	187 ± 112	<0.0001

La prevalenza di IGR (IFG 4.8% vs 5.5%; IGT 12.5% vs 22.8%; IFG+IGT 1% vs 13.4%) aumentava passando dal I al più alto quartile di GGT (14% vs 31%; $p < 0.0001$) (Fig.2).

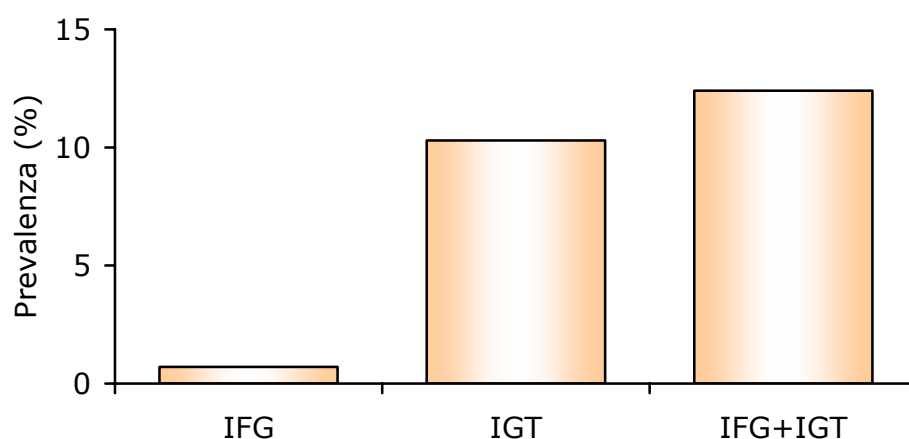


Figura 2. Differenza nella prevalenza delle categorie di regolazione glucidica fra I e IV quartile di GGT.

Rispetto ai soggetti con NGT, quelli con IGT e IFG+IGT mostravano livelli di GGT più alti (27 U/L e 32 U/L in IGT e IFG+IGT vs 21 U/L in NGT; ANOVA: $p<0.0001$) (Fig. 3).

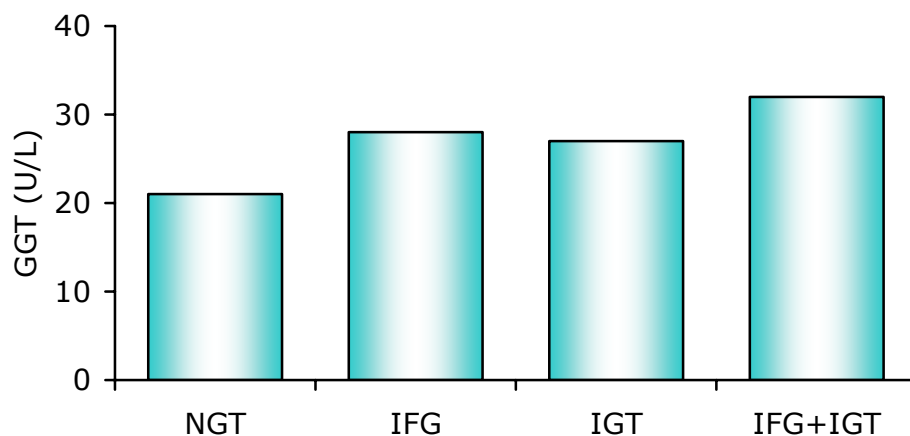


Figura 3. Livelli di GGT in relazione alla classe di tolleranza glucidica. ANOVA: $p<0.0001$.

Il livello di GGT aumentava passando dal I al IV quartile di HOMA-IR (17 ± 11 , 23 ± 13 , 28 ± 20 , 30 ± 15 , rispettivamente; ANOVA: $p<0.0001$).

Passando dal I al IV quartile di GGT, il livello di HOMA-IR aumentava (ANOVA: $p<0.0001$) (Fig. 4), mentre la performance beta-cellulare (Indice insulinogenico/HOMA-IR) si riduceva (ANOVA: $p<0.02$) (Fig. 5).

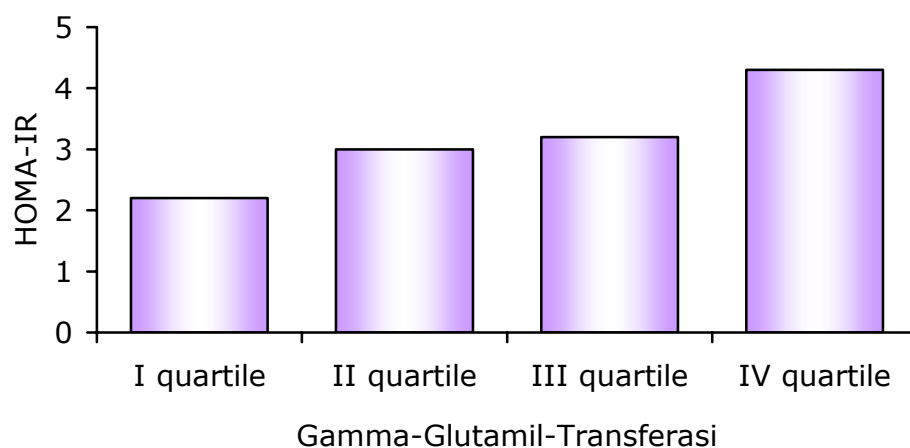


Figura 4. Indice HOMA-IR in relazione ai quartili di GGT. ANOVA: $p<0.0001$.

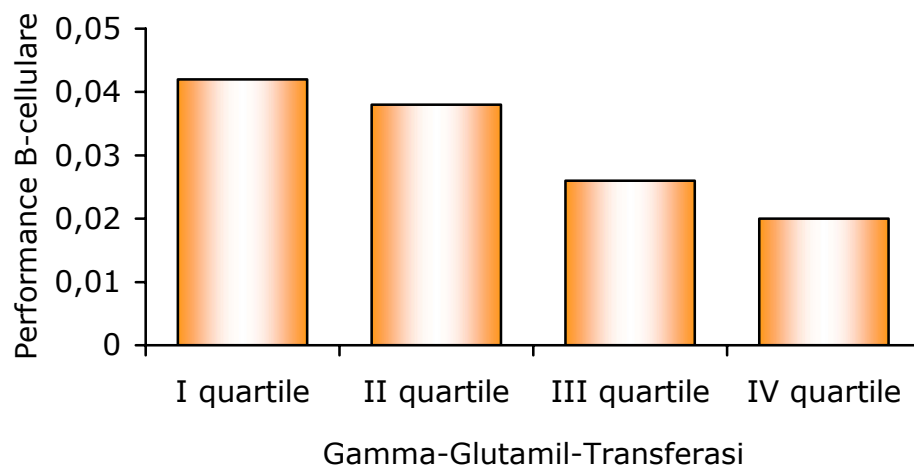


Figura 5. Performance Beta-cellulare in relazione ai quartili di GGT. ANOVA: $p < 0.002$.

L'analisi logistica, aggiustata per età e genere, mostrava che livelli elevati di GGT erano indipendentemente associati a IGT (OR: 1.98; IC: 1.11-3.52) e IFG+IGT (OR: 2.89; IC: 1.37-6.10). Nell'analisi aggiustata anche per BMI, assunzione di alcool, familiarità per diabete, fumo e attività fisica, GGT rimaneva predittore indipendente di IFG+IGT (OR: 3.44; IC: 1.49-7.93). L'inclusione di transaminasi e HOMA-IR nel modello non modificava la significatività di tale associazione (OR: 2.79; IC: 1.07-7.28) (Tab. 3).

Tabella 3. Rischio di alterazione dell'omeostasi glucidica.

	<i>Modello 1</i>		<i>Modello 2</i>		<i>Modello 3</i>	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
IFG						
GGT (IV quartile)	1.92	0.71-5.19	1.69	0.51-5.54	1.24	0.32-4.75
Età	1.05	1.01-1.10	1.05	0.99-1.10	1.04	0.99-1.10
Genere (M)	1.37	0.55-3.42	1.29	0.44-3.78	1.35	0.44-4.13
Familiarità per diabete			0.45	0.16-1.28	0.48	0.16-1.40
Fumo			0.70	0.15-3.32	0.79	0.16-3.76
Alcool			2.41	0.72-8.16	2.40	0.69-8.29
Attività fisica			1.60	0.56-4.62	1.72	0.58-5.09
BMI			0.92	0.82-1.04	0.86	0.76-0.97
AST					1.01	0.90-1.13
ALT					0.99	0.92-1.08
HOMA-IR					1.54	1.21-1.95
IGT						
GGT (IV quartile)	1.98	1.11-3.52	1.75	0.93-3.30	1.21	0.58-2.50
Età	1.06	1.04-1.09	1.07	1.04-1.10	1.07	1.04-1.10
Genere (M)	1.01	0.60-1.70	1.23	0.69-2.21	1.17	0.64-2.12
Familiarità per diabete			1.05	0.61-1.78	1.03	0.60-1.78
Fumo			1.11	0.57-2.14	1.15	0.59-2.26
Alcool			0.84	0.48-1.47	0.86	0.48-1.53
Attività fisica			0.70	0.38-1.29	0.74	0.40-1.36
BMI			1.04	0.99-1.09	0.99	0.94-1.06
AST					0.98	0.92-1.04
ALT					1.03	0.99-1.07
HOMA-IR					1.25	1.04-1.49
IFG+IGT						
GGT (IV quartile)	2.89	1.37-6.10	3.44	1.49-7.93	2.79	1.07-7.28
Età	1.08	1.04-1.12	1.08	1.03-1.13	1.08	1.03-1.13
Genere (M)	1.93	0.94-3.98	2.07	0.90-4.75	2.14	0.92-5.01
Familiarità per diabete			1.26	0.57-2.78	1.33	0.59-2.98
Fumo			1.63	0.64-4.15	1.67	0.64-4.38
Alcool			1.51	0.62-3.66	1.41	0.57-3.49
Attività fisica			0.95	0.41-2.20	1.11	0.47-2.62
BMI					0.93	0.85-1.02
AST					0.95	0.86-1.05
ALT					1.02	0.96-1.07
HOMA-IR					1.44	1.17-1.79

La relazione fra GGT e categorie di alterazione glicemica è stata valutata in tre modelli separati: Modello 1: analisi aggiustata per età e genere; Modello 2: Modello 1 + familiarità per diabete, fumo, consumo di alcool, attività fisica, BMI; Modello 3: Modello 2 + AST, ALT e HOMA-IR.

Discussione

I risultati dello studio condotto dimostrano che i livelli di GGT sono correlati con le differenti categorie di IGR. In particolare, non solo l'attività della GGT appare più elevata in presenza di alterazioni della glucoregolazione, ma anche la prevalenza delle differenti classi di tolleranza glucidica aumenta in relazione al livello delle GGT. Dopo correzione per altri fattori confondenti, la GGT si conferma un predittore indipendente di IGT, ma soprattutto di IFG+IGT. Un dato simile era stato evidenziato nel Mexico City Diabetes Study (12). In tale studio, le concentrazioni di GGT risultavano indipendentemente associate con IGT. Tuttavia, non sono disponibili in letteratura dati relativi alla capacità predittiva della GGT nei confronti di IFG e/o IFG+IGT.

In questo studio, i livelli di GGT appaiono strettamente associati sia con la sensibilità che con la secrezione insulinica, difetti fisiopatologici alla base dell'insorgenza del diabete tipo 2. La relazione fra GGT e insulino-resistenza era stata dimostrata in precedenza (11). Uno studio condotto negli Indiani Pima ha, infatti, evidenziato l'esistenza di una relazione indipendente fra GGT e indice HOMA (11). Tale relazione è stata osservata anche nei bambini dello stesso gruppo etnico (1).

In questo studio, è stata evidenziata l'esistenza di una relazione inversa fra GGT e performance beta-cellulare in soggetti ad alto rischio di diabete, che a nostra conoscenza, non era mai stata fin ora valutata. Questa osservazione potrebbe fornire una plausibile spiegazione fisiopatologica dei risultati degli studi prospettici che hanno dimostrato come elevati livelli di GGT basale (9-10, 12) o variazioni crescenti nel tempo di tale enzima (13) siano predittori indipendenti per lo sviluppo di diabete tipo 2. Tuttavia, risulta ancora poco chiaro il meccanismo mediante il quale questo enzima possa aumentare il rischio di diabete tipo 2. Un aumento della GGT è sempre stato convenzionalmente interpretato come marker di patologie epatobiliari o di consumo d'alcool, ma questo non consente di spiegare l'associazione fra GGT e diabete tipo 2. Sebbene i meccanismi restino ancora ampiamente non noti, recentemente sono state avanzate varie ipotesi. Elevati livelli di GGT potrebbero essere espressione di un eccessivo accumulo di lipidi a livello epatico, in relazione alla presenza o come conseguenza di insulino-resistenza (17). L'accumulo di lipidi a livello

epatico è di per sé responsabile di un'attivazione del processo infiammatorio che viene in seguito amplificato dalla perossidazione lipidica a opera degli enzimi mitocondriali. Nei pazienti con NASH, inoltre, sono state riscontrate anomalie a livello mitocondriale, caratterizzate dalla presenza di inclusioni paracristalline, peraltro non presenti negli individui con sola steatosi epatica (18), che sarebbero responsabili di una maggiore attività perossidativa. Si instaura pertanto una sorta di stress ossidativo cronico che induce una deplezione degli agenti antiossidanti con conseguente eccesso di radicali liberi dell'ossigeno (19).

D'altra parte, elevati livelli di GGT potrebbero riflettere uno stato infiammatorio che altera la trasmissione del segnale insulinico sia a livello epatico che sistemico (20). Studi osservazionali hanno evidenziato una correlazione positiva tra i valori sierici della GGT e dei globuli bianchi, per cui l'aumentata attività dell'enzima potrebbe riflettere uno stato infiammatorio cronico di lieve entità associato o a bassi livelli di sostanze anti-infiammatorie presenti nei soggetti obesi, come l'adiponectina (proteina con attività non solo anti-infiammatoria ma anche insulino-sensibilizzante), oppure ad un ridotto potere dell'insulina di modulare l'azione delle citochine che possono promuovere l'insulino-resistenza (1). Non devono essere trascurati ulteriori aspetti: la GGT ha un ruolo chiave nell'interconversione del mediatore infiammatorio leucotriene C₄, contenente glutathione, in leucotriene D₄ (21), ma verosimilmente svolge anche altri ruoli nel processo infiammatorio: essa è, infatti, localizzata all'interno di granuli intracitoplasmatici in tutte le cellule infiammatorie (polimorfonucleati, monociti, macrofagi, piastrine), ed è stato osservato che topi knock-out per il gene della GGT vanno incontro ad una pesante insufficienza della risposta infiammatoria (22).

Infine, livelli più elevati di GGT potrebbero rappresentare la risposta ad un aumentato stress ossidativo (8). La GGT cellulare è un enzima ectoplasmatico responsabile del catabolismo extracellulare del glutathione ed è ampiamente distribuito in varie cellule con alta attività secretoria o assorbitiva. La GGT gioca, pertanto, un ruolo centrale nel sistema antiossidante con funzione primaria nel mantenimento delle concentrazioni di glutathione intracellulare, critiche nei processi di difesa delle cellule (23-25). Un aumento nell'attività della GGT può rappresentare una risposta allo stress ossidativo. Pertanto, un incremento delle GGT potrebbe identificare

quei soggetti con basso ma persistente incremento dello stress ossidativo. D'altra parte, recenti studi indicano che in condizioni fisiologiche, la GGT è coinvolta direttamente nella genesi di specie reattive per l'ossigeno (26). Numerosi studi, dopo aver riconosciuto l'associazione positiva tra stress ossidativo e diabete mellito tipo 2, hanno cercato di comprendere il danno che lo stress provoca sul DNA delle beta-cellule nello stato di pre-diabete (27). I risultati suggeriscono che, nei soggetti con alterata regolazione glucidica, l'iperglicemia favorisca il predominio dello stress ossidativo sui sistemi di difesa anti-ossidanti (le beta-cellule hanno bassa attività anti-ossidante per cui sono molto vulnerabili all'azione dei ROS) comportando danni a carico del DNA cellulare. Questo processo potrebbe contribuire alla disfunzione beta-cellulare, all'insulino-resistenza e all'iperglicemia stessa (27), provocando la progressione verso il diabete conclamato. L'osservazione che isole pancreatiche esposte ad elevate concentrazioni di glucosio presentano alti livelli intracellulari di perossido ha condotto ad ipotizzare che l'iperglicemia stessa possa generare specie reattive dell'ossigeno. L'azione tossica del glucosio sulla funzione cellulare comporta la scomparsa di due fattori di trascrizione: PDX-1 e Maf-A, importanti regolatori dell'azione insulinica (28-29). Lo stress ossidativo svolge un ruolo non solo eziopatogenetico, ma anche modulatorio nel processo infiammatorio giacché molte specie reattive dell'ossigeno sono mediatori dell'infiammazione o delle funzioni delle cellule infiammatorie. Recentemente è stata anche avanzata l'ipotesi che la relazione esistente fra GGT e rischio di diabete tipo 2 possa essere legata agli effetti dell'esposizione cronica a xenobiotici ambientali (30). Livelli di GGT normali-alti in tal caso potrebbero riflettere la quantità di glutatione coniugato formatosi durante il metabolismo di inquinanti organici. A supporto di tale ipotesi, la valutazione trasversale dell'esposizione a inquinanti organici persistenti nella popolazione del NHNES mostra una relazione simile a quella evidenziata per la GGT, compresa una potente associazione fra obesità e diabete per concentrazioni di inquinanti organici persistenti molto basse (31-32).

Studi epidemiologici hanno mostrato una forte associazione fra GGT (nel range di normalità) e numerosi fattori di rischio cardiovascolari (9, 33-34) o componenti della sindrome metabolica (10). Inoltre, in studi prospettici, il livello basale di GGT è risultato predittore indipendente non solo di diabete,

ma anche di ipertensione arteriosa (35) e ictus (36). In accordo con precedenti osservazioni, anche nel nostro studio, livelli normali-alti di GGT sono risultati associati a un profilo di rischio cardiovascolare peggiore, caratterizzato da più elevati livelli di glicemia, colesterolo LDL, trigliceridi e pressione arteriosa, bassi livelli di colesterolo HDL e maggior prevalenza di sindrome metabolica. Questo potrebbe spiegare l'associazione tra GGT e aumentato rischio di patologie cardiovascolari (6).

Nell'interpretazione di questi risultati, deve essere considerato che il campione esaminato non è rappresentativo della popolazione generale in quanto i partecipanti erano stati indirizzati dal medico di medicina generale ad un programma di screening e prevenzione del diabete poiché presentavano dei fattori di rischio noti per diabete, come la storia familiare, un precedente riscontro di iperglicemia, l'obesità o altre alterazioni metaboliche. Di conseguenza, la prevalenza delle alterazioni della tolleranza glucidica e del diabete misconosciuto possono essere più elevate rispetto a quelle riscontrabili nella popolazione generale, così come la prevalenza di altri fattori di rischio cardiovascolari (sindrome metabolica).

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono che i livelli di GGT possono essere considerati un marker biologico potenzialmente utile per l'identificazione dei soggetti ad alto rischio di diabete e complicanze cardiovascolari.

Bibliografia

1. Ortega E, Koska J, Salbe AD, Tataranni PA, Bunt JC. Serum γ -glutamyl transpeptidase is a determinant of insulin resistance independently of adiposity in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91: 1419-1422.
2. Emdin M, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-Glutamyltransferase, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease Triggering Oxidative Stress Within the Plaque. *Circulation* 2005;112:2078-2080.
3. Lee DS, Evans JC, Robins SJ, Wilson PW, Albano I, Fox CS, Wang TJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Gamma Glutamyl Transferase and Metabolic Syndrome, Cardiovascular Disease, and Mortality Risk The Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:127-133.
4. Paolicchi A, Domenici S, Pieri L et al. Glutathion catabolism as a signiling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1029-37.
5. Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. Gamma-glutamyltransferase. determinants and association with mortality from ischaemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol*. 1995; 142: 699-708.
6. Ruttmann E, Brant LJ, Concini H, et al. Gammaglutamyl transferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiologic investigation in a cohort of 163,944 austrian adults. *Circulation* 2005; 112: 2130-7.
7. Kim Nilssen O, Forde OH, Brenn T. The Tromso Study. Distribution and population determinants of gammaglutamyltransferase. *Am J Epidemiol*. 1990; 132: 318-26.
8. Lim JS, Yang JH, Chun BY et al. Is serum gamma-glutamyl transferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1018-1023.
9. Lee DH, Jacobs Jr DR, Gross M et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49:1358-1366.
10. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum γ -Glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004; 27:1427-1432.
11. Yokoyama H, Hirose H, Moriya S, Saito I. Significant correlation between insulin resistance and serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in non-drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26:91S-94S.

12. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S et al. Mexico City diabetes study. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005; 28:1757–1762.
13. André P, Balkau B, Born C et al. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. *Diabetologia* 2006; 49:2599-2603.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
15. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
16. Executive summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
17. Marchesini G, Forlani G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* 2002; 35:497–499.
18. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK et al: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120, 1183-1192, 2001
19. Marzocchi R, Zannoni C, Moscatiello S, Marchesini G. La steatosi epatica non alcolica: una patologia emergente di interesse metabolico. *GIDM* 2004; 24:107-115.
20. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 (Suppl 3): S53–S55. Lee DH, Jacobs Jr DR. Association between serum gamma-glutamyltransferase and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005; 178:327–330.
21. Anderson ME, Allison RD, Meister A. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyltranspeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl aminoacids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 1088-91.
22. Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, et al. Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7923-6.

23. Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. g-Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:586-92.
24. Takahashi Y, Oakes SM, Williams MC, Takahashi S, Miura T, Joyce-Brady M. Nitrogen dioxide exposure activates g-glutamyl transferase gene expression in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143:388-96.
25. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of g-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001;276:3798-804.
26. Paolicchi A, Tongiani R, Tonarelli P, Comporti M, Pompella A. G-Glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med* 1997;22:853-60.
27. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Scin* 2007; 112:599-606.
28. Robertson R, Zhou H, Zhang T, Harmon JS. Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48:139-146.
29. Robertson RP. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:615-9.
30. Lee DH, Steffes MW, Jacobs DR Jr. Can persistent organic pollutants explain the association between serum gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes? *Diabetologia* 2008;51(3):402-7.
31. Lee DH, Lee IK, Porta M, Steffes M, Jacobs DR Jr (2007) Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetologia* 50:1841-1851
32. Lee DH, Lee IK, Jin SH, Steffes M, Jacobs DR Jr (2006) Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* 30:622-628.
33. Monami M, Bardini G, Lamanna C, Pala L, Cresci B, Francesconi P, Buiatti E, Rotella CM, Mannucci E. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism* 2008;57:387-92.

34. Kim DJ, Noh JH, Cho NH et al. Serum γ -glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005; 22:1134–1140.
35. Miura K, Nakagawa H, Nakamura H, Tabata M, Nagase H, Yoshida M, et al. Serum gamma-glutamyl transferase level in predicting hypertension among male drinkers. *J Hum Hypertens* 1994;8:445–9.
36. Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. Serum gamma-glutamyl transferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke. *Stroke* 2000;31:1851–5.